

**SEROLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR VERBREITUNG VON
BK VIRUS - INFESTIONEN**

von

Hanns - Joachim Rziha

aus

Bad Tölz

1979 № 1 12



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SEROLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERBREITUNG VON BK VIRUS - INFEKTIONEN



Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Hanns - Joachim Rziha

aus

Bad Tölz



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 14.2.1979

Vorsitzender der Promotionskommission:	Professor Dr. E. Schweizer
Erstberichterstatte:	Professor Dr. W. Heumann
Zweitberichterstatte:	Professor Dr. H. zur Hausen
Dritter Berichterstatte:	Professor Dr. H. Kersten

Meinen Eltern und
Helga gewidmet.

Herrn Prof. Dr. H. zur Hausen danke ich für die Überlassung des Themas und die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Arbeit.

Für die Betreuung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. W. Heumann.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. W. Bornkamm sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die stets gewährte wissenschaftliche und menschliche Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre, was entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. C. Duhme (Prof. Dr. L. Horbach, Institut für Medizinische Statistik der Universität Erlangen-Nürnberg) danke ich für die Hilfe bei den statistischen Berechnungen.

Frau Roming danke ich für die Geduld bei der Fertigstellung des Manuskripts.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	5
1. Virus und Zellkultur	5
2. Klinisches Untersuchungsmaterial	5
3. Lösungen	6
4. Reagentien	8
5. Enzyme	10
6. Geräte	12
7. Virusnachweis durch Hämagglutination	13
8. Virusreinigung	14
9. Virusisolierung aus Urinproben	16
10. Reinigung viraler DNS	16
11. Präparation der Virusproteine	17
12. Plaque-Test	19
13. Leukozytenpräparation	19
14. Nachweis viraler Antikörper	20
14.1. Hämagglutinationshemmtest (HHT)	20
14.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)	22
14.3. Nachweis BK virusspezifischer IgM-Antikörper	23
15. Nachweis viraler Antigene	25
15.1. Nachweis viraler Capsidantigene	25
15.2. T-Antigennachweis	26
16. Elektronenmikroskopische Präparationen	26
16.1. Negativkontrastierung	26
16.2. Darstellung viraler DNS	26
16.2.1. Mikrodiffrusionstechnik	26
16.2.2. Spreitungstechnik	27
16.3. Präparation von Ultradünnschnitten	27
16.4. Immunelektronenmikroskopie	28
17. Spaltung viraler DNS mit Restriktionsenzymen	28
18. Gelelektrophorese viraler DNS-Fragmente	29

19.	Bestimmung der Molekulargewichte der DNS-Fragmente	29
20.	Gelelektrophorese viraler Proteine	31
21.	Extraktion zellulärer DNS	32
22.	In vitro Markierung viraler DNS	32
23.	DNS-DNS Hybridisierung	33
24.	Abkürzungen	34

C. Ergebnisse

1.	Virusvermehrung und Kultivierungsbedingungen	35
1.1.	Einfluß der Virusmultiplizität	35
1.2.	Temperaturoptimum	38
1.3.	Einfluß der Häufigkeit der Subkultivierung	38
1.4.	Virusproduktion in verschiedenen Gewebe- kulturzellen	38
2.	Gewebekulturnachweis	41
2.1.	Koinfektionsversuche	41
2.2.	Plaque-Tests	42
3.	Infektion menschlicher Leukozyten	43
4.	Virusspezifische Antigene	43
4.1.	Virale Capsid-Antigene	44
4.2.	T-Antigen	44
5.	Virusspezifische Antikörper	46
5.1.	Durchseuchung der Allgemeinbevölkerung	50
5.2.	IgM-Antikörper in Nabelschnurblutseren	52
5.3.	Antikörper bei Kindern mit angeborenen Schädigungen	52
5.4.	Antikörper bei Tumorpatienten	54
5.5.	Antikörper bei Patienten mit Immun- mangelkrankheiten	56
5.6.	Untersuchung von Serumpaaren	57
6.	Vergleich der verschiedenen Virusisolate	59
6.1.	Physikalische und biologische Eigen- schaften	60
6.2.	Vergleich der viralen DNS	67
6.2.1.	Spaltung mit der Restriktionsendo- nuklease von Escherichia coli (Eco RI)	67

	Seite
6.2.2. Spaltung mit der Restriktionsendo- nuklease von Haemophilus influenza d (Hind II/III)	69
6.2.3. Spaltung mit der Restriktionsendo- nuklease von Haemophilus aegyptius (Hae III)	70
6.2.4. Spaltung mit der Restriktionsendo- nuklease von Arthrobakter luteus (Alu I)	73
6.3. Vergleich der Virusproteine	75
7. Versuche zum Virusnachweis in Tumoren	79
7.1. DNS-DNS Hybridisierung	79
7.2. In Ultradünnschnitten	80
 D. Diskussion	 81
 E. Zusammenfassung	 100
 F. Literaturangaben	 103

A. EINLEITUNG

Papovaviren, kleine ikosaedrische Viren mit doppelsträngiger DNS, werden auf Grund ihrer Größe und Morphologie in die Untergruppe der Papillomviren (Warzenvirus, 55 nm) und der etwas kleineren Polyomaviren (40-44 nm) unterteilt (MELNICK, 1976). Letztere finden sich natürlicherweise in Mäusen (Polyoma und K-Virus), in Kaninchen (RK Virus) und Affen (Simian Virus SV 40), wo sie latente Infektionen verursachen. Von keinem dieser Viren war bis 1965 bekannt, ob sie den Menschen infizieren können, bis ZURHEIN und CHOU (1965) ein solches Polyomavirus in Ultradünnschnitten im Gehirn eines Patienten mit progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie (PML) nachwiesen. Bei dieser seltenen Krankheit handelt es sich um eine langsam fortschreitende Infektion des Nervensystems, die in einer Zerstörung bestimmter Stützsubstanzzellen (Oligodendrozyten) resultiert (GARDNER, 1977). Schließlich gelang es 1971 PADGETT et al. (1971) ein Papovavirus (JC Virus) aus dem Gehirn eines solchen PML-Patienten zu isolieren. Auf Grund der regelmäßigen Assoziation des JC Virus im Hirn von PML-Patienten (NARAYAN et al., 1973; WALKER et al., 1974) wird eine Virus-ätiologie dieser Krankheit angenommen. Offensichtlich kann die Virusinfektion bei Individuen mit Störungen des Immunsystems zur Erkrankung führen (PADGETT und WALKER, 1976).

Ebenfalls 1971 wurde aus dem Urin eines Patienten nach Nierentransplantation ein weiteres menschliches Papovavirus isoliert, das BK Virus, nach den Initialen des Patienten so benannt (GARDNER et al., 1971). Dieses aus 72 Kapsomeren zusammengesetzte Virus mit einer Größe um 43 nm (SEEHAFER et al., 1975), wurde seitdem häufig aus dem Urin verschiedener Patienten isoliert. So fand sich BK Virus im Urin von Patienten mit Störungen des Immunsystems, die entweder auf Grund angeborener Defekte (TAKEMOTO et al., 1974), oder durch Behandlung mit Immunsuppressiva wegen verschiedener maligner Erkrankungen (REESE et al., 1975; LECATSAS et al., 1976a, c;

GARDNER, 1977; HENRY et al., 1977; PAUW und CHOUFOER, 1978), oder nach Nierentransplantation (COLEMAN et al., 1973; LECATSAS et al., 1973, 1976b; DOUGHERTY und DISTEFANO, 1974; JUNG et al., 1975) aufgetreten waren. Lediglich in einem Fall konnte BK Virus nicht nur aus dem Urin, sondern auch aus einem Retikulumszellsarkom des Gehirns eines Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) isoliert werden (TAKEMOTO et al., 1974). Bei dieser Krankheit handelt es sich um einen geschlechtsgebundenen Defekt der zellulären und humoralen Immunabwehr (BLAESE et al., 1968). In neuerer Zeit wurden BK Viruspartikel auch in Patienten ohne Störungen des Immunsystems nachgewiesen, wie bei einem Kind mit schweren Störungen im Nierentrakt (HASHIDA et al., 1976) und bei Kindern mit angeborenen zerebralen Störungen und Mißbildungen (RZIHA et al., 1978b). Serologische Studien in verschiedenen Ländern zeigen durch den Nachweis BK virus-spezifischer Antikörper in Seren der Allgemeinbevölkerung eine hohe Durchseuchungsrate. Die Primärinfektion findet darnach im frühen Kindesalter (um 5 Jahre) statt, während bei Erwachsenen noch zu 70% Antikörper gegen BK Virus nachweisbar bleiben (GARDNER, 1973; MÄNTYJÄRVI et al., 1973; SHAH et al., 1973; PORTOLANI et al., 1974; BROWN et al., 1975; RZIHA et al., 1978a). Die Frage nach dem Zusammenhang bestimmter klinischer Symptome und der Primärinfektion, sowie des Übertragungswegs des Virus konnte bisher nicht geklärt werden. Möglicherweise findet die Mehrzahl der Infektionen durch eine Reaktivierung des seit der Primärinfektion persistierenden BK Virus statt. Offensichtlich ist dies bei Patienten begünstigt, die sich in einer immunologisch anomalen Situation befinden. Hier kann die Virusausscheidung zwischenzeitlich über Monate, ja sogar Jahre andauern (GARDNER, 1970). Als Ort der Virusvermehrung kennt man bisher nur den Urogenitaltrakt und das Gehirn.

Charakteristisch für alle Papovaviren ist deren Fähigkeit zur Induktion von Tumoren. So lassen sich auch mit dem BK Virus in Versuchstieren Tumoren des Gehirns erzeugen (SHAH et al., 1975; COSTA et al., 1976; DOUGHERTY et al. 1976; UCHIDA et al., 1976; VAN DER NOORDA, 1976; GREENSLEE et al., 1977; CORALLINI et al.,

1977), wenn auch mit geringerem Erfolg als mit JC Virus (GARDNER, 1977). Weiterhin wurde die onkogene Fähigkeit des Virus in zahlreichen Transformationsversuchen verschiedener Säugerzellen gezeigt (PORTOLANI et al., 1975; STEN et al., 1976; TAKEMOTO und MARTIN, 1976; COSTA et al., 1977; MASON und TAKEMOTO, 1977; SEEHAFFER et al., 1977; PORTOLANI und BROGATTI, 1978).

Da bekannt ist, daß das Krebsrisiko für Immunmangelpatienten, sei es wegen angeborener Fehler oder durch Drogenbehandlung, deutlich erhöht ist (LEIBOWITZ und SCHWARTZ, 1971; WALDMANN und STROBER, 1972; HOOVER und FRAUMENI, 1973; KERSHEY et al., 1973), stellt sich die Frage nach einem eventuellen Zusammenhang von BK Virusinfektionen und menschlichen Neoplasien.

Menschliche Papovaviren lassen sich in vitro nur in einem sehr begrenzten Zellspektrum vermehren (SEEHAFFER et al., 1975). So läßt sich BK Virus nur in menschlichen Zellen und bestimmten Affenzellen produktiv anzüchten. BK Virus scheint ausschließlich den Menschen als natürlichen Wirt zu infizieren (PADGETT und WALKER, 1976).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Verbreitung und Persistenz humanpathogener Papovaviren, speziell des BK Virus, in verschiedenen Bevölkerungsgruppen zu untersuchen. Sero-epidemiologische Studien zeigten eine weite Verbreitung von BK Virusinfektionen im süddeutschen Raum. Die Primärinfektion findet im frühen Kindesalter statt. Die Persistenz BK virusspezifischer Antikörper bis ins hohe Lebensalter läßt auf eine fortgesetzte Anwesenheit des BK Virus im Organismus schließen. Seren verschiedener Tumorpatienten, wie Patienten mit angeborenen Immundefekten und von Kindern mit bestimmten angeborenen Schädigungen zeigten nahezu durchweg eine höhere Rate BK virusspezifischer Antikörper und höhere Durchschnittstitern. Zum Auffinden einer Primärinfektion wurde eine Methode zum Nachweis virusspezifischer IgM-Antikörper entwickelt und

zur Untersuchung der einzelnen Patientengruppen benutzt. Serologische Teste an Nabelschnurblutseren ließen vermuten, daß auch eine vertikale Übertragung des Virus von der Mutter auf das Kind durch die Plazenta vorzukommen scheint. Ein möglicher Zusammenhang der BK Virusinfektion und embryonaler, beziehungsweise fötaler Schädigungen wird diskutiert.

BK Virus konnte aus Urinproben von 6 Patienten mit verschiedenen Tumoren, von 4 Patienten mit angeborenen Immunmangelkrankheiten, sowie von zwei Kleinkindern mit angeborenen zerebralen Mißbildungen isoliert werden. Ein Vergleich dieser Virusisolate bezüglich biologischer Eigenschaften ergab weitgehende Übereinstimmung, wie auch vergleichende Untersuchungen der viralen Proteine. Die Charakterisierung der Desoxyribonukleinsäuren der Virusstämme durch Spaltung mit bakteriellen Restriktionsenzymen ergaben leichte Unterschiede untereinander und zum BK Virus-Prototyp. Diese Unterschiede ließen sich zum Teil durch eine Heterogenität des viralen Genoms erklären. In einigen Fällen jedoch ließen die Spaltmuster eine gewisse Stammspezifität vermuten.

Außerdem wurde versucht, durch Hybridisierungsexperimente virusspezifische Nukleinsäuresequenzen in einigen menschlichen Tumoren nachzuweisen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Virus und Zellkultur

BK Virus Prototyp wurde freundlicherweise von Frau Dr. S.D. Gardner zur Verfügung gestellt. Die Virusanzüchtung erfolgte auf Verozellen bei 37° C in Eagle's Medium (MEM) mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 3.5 ml/500 ml Glutamin.

Simian Virus 40 (SV 40) wurde von Herrn Dr. G. Brandner aus Freiburg überlassen.

Adenovirus Typ 2 reinigte Frau G. Werner im Institut.

Folgende Gewebekulturzellen wurden benutzt:

<u>Vero:</u>	permanente Zelllinie spontan ausgewachsener Nierenzellen afrikanischer, grüner Meerkatzen (Cerco-pithecus aethiops).
<u>Rita:</u>	permanente Zelllinie afrikanischer, grüner Meerkatzen
<u>OMK:</u>	Zelllinie von Nierenzellen aus Eulenaffen
<u>CV-1:</u>	spontan transformierte Nierenzellen afrikanischer, grüner Meerkatzen
<u>HEL:</u>	primäre menschliche Lungenfibroblasten
<u>HEK:</u>	primäre menschliche Nierenzellen
<u>HSF:</u>	primäre menschliche Hautfibroblasten
<u>HEB:</u>	primäre menschliche Hirnzellen
<u>KB:</u>	permanente menschliche Zelllinie

Alle Zellkulturen wurden im Institut gehalten. Die primären menschlichen Zellen wurden von Embryonen angelegt.

2. Klinisches Untersuchungsmaterial

Alle Serumproben von gesunden Spendern und ein Teil der Seren von Tumorpatienten stammten aus der Serumsammlung des Instituts. Die übrigen Seren und Urinproben von Patienten mit

malignen Erkrankungen erhielt ich von Herrn Dr.H.U. Schwenck und Herrn Dr.U. Schneider aus der Universitäts-Kinderklinik Erlangen. Die Seren und Urine von Kindern mit verschiedenen angeborenen Schädigungen stammten von Herrn Dr. Große aus der Universitäts-Kinderklinik Erlangen. Herr Dr.B. Belohradsky, Hauner'sche Kinderklinik der Universität München, schickte mir das gesamte klinische Untersuchungsmaterial der Patienten mit Immunmangelkrankheiten. Die Nabelschnurblutseren erhielt ich von Herrn Dr. K. von Maillot aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen. Alle Serumproben waren bei -20°C , die Urinproben bei -20°C oder -70°C gelagert worden.

Die verschiedenen Tumormaterialien stammten von Herrn Dr. B. Belohradsky, sowie von Herrn Dr. J. Werner vom Universitäts-klinikum Essen.

Die untersuchten Epstein Barr-Virus Biopsien stammten aus der Tumorsammlung des Instituts. Alle Tumoren waren bei -70°C aufbewahrt worden.

3. Lösungen

- Bleicitratlösung:

1.33 g Bleicitrat gelöst in 15 ml frisch dest. Wasser und 1.76 g Natriumcitrat gelöst in der gleichen Wassermenge wurden zusammen in einem Erlenmeyerkolben stehen gelassen. Nach Zugabe von 8.0 ml 1 N NaOH, bis die Lösung klar war, wurde mit dest. Wasser auf 50 ml aufgefüllt, und ein pH-Wert genau 12.0 eingestellt. Bis zum Gebrauch wurde die Lösung bei -20°C aufbewahrt.

- Dextran-Glukose-Veronal-Puffer (DGV):

200 ml 0.3% Gelatine im kochenden Wasserbad gelöst, 1 ml 2 % CaCl_2 , 1 ml 10 % MgCl_2 , 50 ml 17 % NaCl, 50 ml 20 % Glukose, 100 ml 0.16 % 5,5 - Diäthylbarbitursäure-Na-Salz (Veronal). pH auf 7.0 eingestellt und auf 1000 ml mit dest. Wasser aufgefüllt, 45 min bei 1 atü autoklaviert.

- Elektrophoresepuffer für DNS-Gele, 50-fach konzentriert:
484.6 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (2 M), 41.0 g Natriumacetat (wasserfrei, 0.25 M), 37.2 g EDTA in 1.4 l dest. Wasser gelöst, pH auf 7.8 eingestellt, und auf 2 l aufgefüllt (DANNA et al., 1973).
- Elektrophoresepuffer für Proteingele:
62.5 ml Tris-HCl (0.025 M), 500 ml 0.96 M Glycin (0.192 M), 25 ml 10 % SDS (0.1 %), 0.25 ml 2-Mercaptoäthanol (0.01 %), 25 ml 0.1 M EDTA (0.001 M), pH 8.3, mit dest. Wasser auf 2500 ml aufgefüllt.
- Elvanol, Einbettungsmittel (RODRIGUEZ und DEINHARDT, 1960):
20 g Elvanol 51-05 (du Pont Polyvinylalkohol) und 80 ml PBS gemischt, 15 min bei 1 atü autoklaviert. Dazu 40 ml Glyzerin, erneut autoklaviert, pH zwischen 6.0 und 7.0.
- Fötale Kälberserum, Rehatuin:
Reheis Chemical Company, Phoenix Arizona USA.
- MEM, minimal essential medium nach EAGLE (1959):
Grand Island Biological Co., Grand Island N.Y. USA.
- Millong Puffer:
83 ml 2.26 % $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 17 ml 2.52 % NaOH. Davon 90 ml zu 10 ml 5.4 % Glukose.
- MTP - Medium:
RPMI - 1640 ohne Bicarbonat mit 100 µg/ml Streptomycin, 3.5 ml Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 1 ml/500 ml Gentamycin, 0.1 M Natriumpyruvat, 5 ml 50 X essentielle und 5 ml 100 X nicht-essentielle Aminosäuren, sowie 7.6 ml Hepeslösung.
- Orceinlösung nach FOGH und FOGH (1964):
2 g Orcein wurden unter Rühren in 60 ml Eisessig 10 min gekocht. Nach Abkühlen auf 55°C wurde mit Eisessig auf 60 ml aufgefüllt und 40 ml dest. Wasser zugegeben. Nach viermaligem Zentrifugieren bei 2000 upm über 10 min wurde durch ein 0.2 µm-Filter filtriert.

- PBS, Phosphat-gepufferte Salzlösung nach DULBECCO und VOGT (1954):
8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , 0.167 g $\text{CaCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0.1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ auf 1000 ml dest. Wasser.
- RPMI - 1640:
Flow Laboratories, England.
- Szintillator TT33:
40 g PPO, 2 g POPOP, 3.33 l Triton X-100, 6.66 l Toluol.
- Tris - EDTA (TE) - Puffer:
1.21 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (0.01 M), 0.037 g Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz (0.001 M) auf 1000 ml dest. Wasser, pH 8.1.
- Trypsinlösung:
0.25 % Trypsin in Hank's Salzlösung, 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 g D(+) Glukose, 3 g Tris, 2.5 g Trypsin, 5 mg Phenolrot, pH 7.5 auf 1000 ml dest. Wasser.
- Veronalpuffer:
Zu 25 ml einer 1 M $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0.3 M $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ Lösung kamen 415 g NaCl, 51 g 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz und 173 ml HCl, pH 7.2 - 7.4, auf 10 l mit dest. Wasser aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde 1:5 verdünnt.
- Virusstandard-Puffer (VSB):
0.01 M Tris, pH 7.4, 0.01 M KCl, 0.005 M EDTA.

4. Reagentien

- Agarose Seakem:
Marine Colloids Inc., Rockland, Maine, USA
- Antihuman IgG- und IgM-FITC:
DAKO-Immunglobuline, Medac, Hamburg
- Biogel A:
Bio-Rad Lab., München
- Cytochrom C:
Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

- DEAE-Zellulose:
Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt (Main)
- Genetron 113, 1,1,2-Trichlor-trifluoräthan:
Fluka AG, Buchs, Schweiz
- Immundiffusionsplatten, Tri-Partigen-IgG und -IgM:
Behringwerke AG, Marburg (Lahn)
- Liquemin:
Hofmann La Roche AG, Grenzach
- Mikrotiterplatten:
Cooke Microtiter System, Dynatech Lab. Ltd., Sussex,
England
- Moronal Squibb:
von Heyden, München
- Multi-Handverdünner, Titertek:
Flow Lab., Bonn
- Nitrozellulosefilter:
Sartorius, Göttingen
- PPO, POPOP:
Koch-Light Lab. Ltd., Colbrook, England
- Phosphorzellulose:
Whatmann P11, Whatman Biochemicals Ltd., Maidstone,
England
- Protein A - Sepharose CL-4B:
Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt /M.
- RDE, receptor destroying enzyme:
Flow Lab., Bonn
- Sephadex G-50:
Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt (Main)
- Triton X-100:
Röhm und Haas, Frankfurt (Main)

- Visking Dialysesschläuche:
Union Carbide, Chicago, USA

Alle verwendeten radioaktiven Substanzen waren von Amersham Buchler, Braunschweig bezogen. Die übrigen Chemikalien stammten von den Firmen Serva, Heidelberg und Merck, Darmstadt.

5. Enzyme

Desoxyribonuklease (DNase), RNase-frei

Fa. Serva, Heidelberg

Proteinase K aus *Streptomyces griseus*

Fa. Merck, Darmstadt

Ribonuklease (RNase) aus Pankreas

Fa. Merck, Darmstadt

Trypsin aus Rinderpankreas

Fa. Difco, Detroit, USA

Eco RI, Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli* (GREENE et al., 1974) und

Hae III, Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus aegyptius* (MIDDLETON et al., 1972)

Fa. Miles GmbH, Frankfurt (Main)

Hind II und III, Restriktionsendonukleasen aus *Haemophilus influenzae* (SMITH und WILCOX, 1970) wurden von Herrn Dr. L. Gissmann im Institut gereinigt.

Alu I, Restriktionsendonuklease aus *Arthrobakter luteus* (ROBERTS et al., 1976) reinigte ich in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G.W. Bornkamm aus 10 g Bakterien, die wir von Herrn Dr. R.E. Streek aus München erhielten. Die tief gefrorenen (-70°C) Bakterien wurden nach Auftauen in 20 ml 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M 2-Mercaptoäthanol (2-ME) resuspendiert, 30mal 30 Sekunden mit 80 Watt beschallt und im 60 Ti-Rotor bei 45000 upm, 4°C während 90 Minuten ultrazentrifugiert. Zur Klärung des Überstands (S-100) wurde eine zweite Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge bei 14000 upm, 4°C für 60 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde auf 1 M NaCl gebracht und durch Chromatographie auf einer

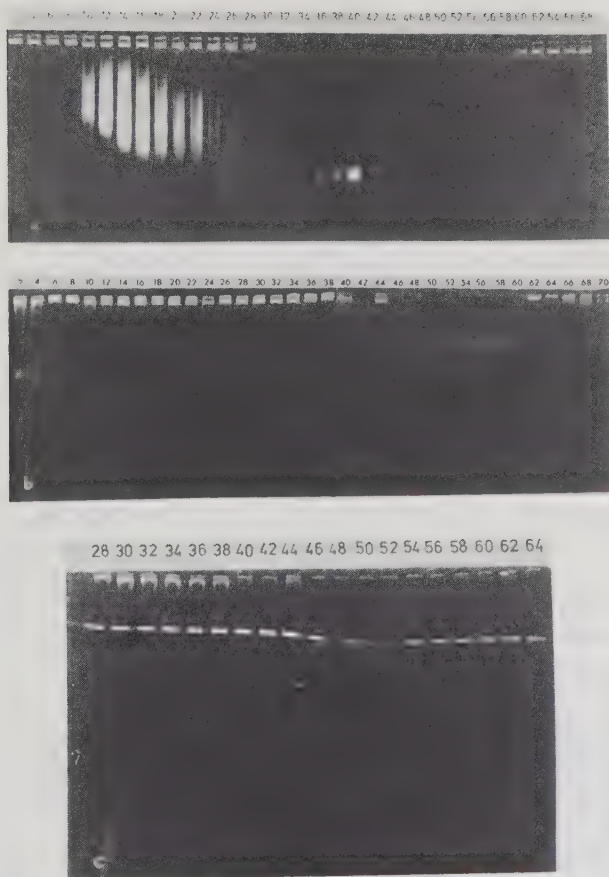


Abb. 1: Alu I-Reinigung: (a) Austesten der Fraktionen von der Biogel A-Säule, (b) von der Phosphorzellulose-Säule und (c) von der DEAE-Zellulose-Säule.

Biogel A-Säule (50 X 2 cm) die bakterielle DNS abgetrennt. Nach Elution mit 1.0 M NaCl, 0.01 M 2-ME, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5 wurden 2 µl jeder zweiten Fraktion mit 200 ng BK Virus-DNS getestet, und eine Elektrophorese durch ein 4%iges Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Fraktionen mit Nukleaseaktivität (Fraktionen 39-56, Abb. 1a) wurden gesammelt und gegen 2 l PC-Puffer (10% Glycerol, 0.01 M KPO_4 , 0.01 M 2-ME, 0.001 M EDTA, pH 7.4) über Nacht bei 4°C dialysiert. Nach Chromatographie durch eine Phosphorzellulose-Säule (25 X 0.9 cm) und Elution mit 200 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 1.0 M KCl wurden wiederum die einzelnen Fraktionen mit BK Virus-DNS auf Enzymaktivität getestet. Alu I wurde bei einer Salzkonzentration von 0.6 bis 0.75 M KCl eluiert. Die entsprechenden Fraktionen (46-58, Abb. 1b) wurden gesammelt und gegen 2 l PC-Puffer über Nacht dialysiert. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Chromatographie über eine DEAE-Zellulose-Säule (25 X 0.9 cm) durchgeführt, und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.3 M KCl eluiert. Nach Austesten der Fraktionen mit BK Virus-DNS fand sich Alu I bei einer Salzkonzentration von 0.23 M KCl. Die Fraktionen 46-52 und 53-58 (Abb. 1c) wurden getrennt gesammelt und durch Dialyse gegen 500 ml 50% Glycerol, 0.01 M KPO_4 , 0.01 M 2-ME, 0.001 M EDTA über Nacht bei 4°C konzentriert. Die Aufbewahrung des Enzyms erfolgte bei -20°C.

Die jeweils eingesetzten Mengen der Restriktionsendonukleasen wurden durch Spaltung mit Adenovirus Typ 2 DNS, die Frau G. Werner im Institut präparierte und λ DNS (Fa. Serva, Heidelberg) bestimmt.

6. Geräte

- Zentrifugen: Christ, UJ III S
Hettich, Rotosilenta K
- Ultrazentrifugen: Beckman, L 3-50 und L 5-50

- Mikroskop: Leitz Orthoplan mit Phasenkontrast nach Zernicke, Auflichtilluminator nach Ploem. Leitz Diavert, Durchlicht.
- Elektronenmikroskop: Zeiss EM 10
- Szintillationszähler: Packard, Tricarb 3375
Berthold und Friseke, Betaszint 5000
- Spektralphotometer: Zeiss PMQ II
Gilford 240
- Lyophilisiergerät: Gardiner, N.Y., USA
- Gefriertruhen: Gardiner, N.Y., USA
- Hochvakuumanlage: Edwards E 12 E
- Elektrophoresekamern: Hoefer Sc. Instr., San Francisco, USA
- Spannungsgeräte: Hoefer Sc. Instr., San Francisco, USA
- UV-Lampe: C 51, Ultra Violet Products Inc., San Gabriel, USA
- Refraktometer nach Abbé: Zeiss 88396
- Ultraschallgerät: Sonifier B 12, Branson Sonic Power Comp., USA
- CO₂-Brutschrank: Heraeus
- Coulter counter: ZF, Coulter Electronics Ltd., England

7. Virusnachweis durch Hämagglutination

BK Virus besitzt die Eigenschaft menschliche rote Blutkörperchen des O-Typs oder Meerschweinchenerythrozyten zu agglutinieren. So ließ sich mittels des Hämagglutinationstests (HA) der Nachweis von BK Virus im Zellkulturüberstand führen. Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit einem Einheitsvolumen von 0.025 ml durchgeführt (GARDNER et al., 1971). Ungefähr 1 ml des Kulturüberstands wurden mit dem gleichen Volumen Genetron extrahiert, um unspezifische Hemmstoffe der Hämagglutination zu entfernen (MÄNTYJÄRVI et al., 1972, 1973). Nach Anlegen einer geometrischen Verdünnungsreihe in DGV und Zugabe einer 0.25%-igen Lösung menschlicher O-Erythrozyten eines gesunden Spenders in DGV wurden die Testplatten 4 bis 5 Stunden bei 4°C

inkubiert, bis die Erythrozyten vollständig sedimentiert waren. Die höchste Verdünnungsstufe, die noch vollständige Hämagglutination ergab, wurde als eine hämagglutinierende Einheit (HAU) bezeichnet. Diese entspricht ca. 3×10^6 BK Viruspartikeln (MÄNTYJÄRVI et al., 1973).

8. Virusreinigung

Die Überstände BK Virus-infizierter Zellkulturen wurden nach Auftreten zytopathogener Veränderungen und bei positiver Reaktion im HA-Test gesammelt. Wenn der Zellrasen durch die Virusvermehrung nahezu degeneriert war, wurden die restlichen Zellen mit einem Gummischaber von der Glaswand der Kulturflaschen abgeschabt und zusammen mit den Überständen niedrigtourig zentrifugiert (2000 upm, 4°C , 20 min). Die sedimentierten Zelltrümmer wurden dreimal bei -20°C eingefroren und bei 37°C aufgetaut, sowie dreimal 1 min mit 80 Watt beschallt. Nach einer weiteren niedrig-tourigen Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und zur Virusanreicherung im Rotor Typ 19 bei 18000 upm, 4°C über 3 Stunden zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde vorsichtig in VSB aufgenommen und mit festem CsCl auf eine Dichte von 1.34 g/ml eingestellt. Die hierzu benötigte Menge an CsCl wurde nach der Formel von ROBINSON und STOKES (1955) berechnet:

$\text{g CsCl/ml Lösung (w/v)} = 1.3748 \times \rho_1 - 1.3811$ (ρ_1 = Eingangsdichte). Im SW 56-Rotor wurde eine Gleichgewichtszentrifugation bei 35000 upm, 4°C über 48 Stunden durchgeführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann von unten angestochen und zu 0.2 ml-Fractionen ausgetropft. Waren genügend Viruspartikel vorhanden, zeigten sich nach der Gleichgewichtszentrifugation zwei Banden (Abb. 2a), die den vollen und leeren Capsiden entsprachen (Abb. 2b). Der Verlauf des Gradienten wurde refraktometrisch vermessen, und die Extinktion der einzelnen Fractionen nach Zugabe von 0.2 ml VSB im Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Virus enthaltenden Fractionen wurden gesammelt und dreimal gegen 2 l 0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.001 M EDTA bei 4°C dialysiert.

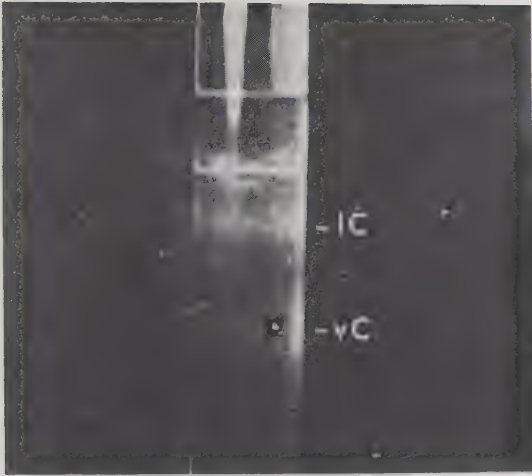


Abb. 2a: Sichtbare Banden gereinigter BK Viruspartikel nach Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten.
1C: leere Capside, vC: volle Capside



Abb. 2b: Darstellung gereinigter, voller BK Viruscapside im Elektronenmikroskop nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat.

9. Viruserisolierung aus Urinproben

Um BK Virus in Urinproben nachzuweisen wurden zwei Wege eingeschlagen. Einmal wurde versucht Virus direkt im Rohurin darzustellen. Dazu wurden, wie unter 8. beschrieben, durch niedrig-tourige Zentrifugation Zellreste entfernt und eine Virusanreicherung in der Ultrazentrifuge durchgeführt. Das resuspendierte Sediment wurde anschließend im Elektronenmikroskop auf Anwesenheit von Viruspartikeln geprüft. Wurden dabei genügend Virionen entdeckt, und standen ausreichende Mengen an Urin zur Verfügung, so wurde analog zu 8. eine CsCl-Gleichgewichtszentrifugation durchgeführt.

Der zweite Weg war die Virusanzüchtung in der Gewebekultur. Subkonfluente HEL- oder Verozellen wurden mit 2 - 5 ml Urin inokuliert, und eine Stunde bei 37°C unter viertelstündigem Schwenken zum Zwecke der Adsorption inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, und, wie unter 1. beschrieben kultiviert. Um ein Bakterien- und Pilzwachstum zu vermeiden, war dem Nährmedium Gentamycin (80 µg/ml) und Moronal (100 Einheiten/ml) beigelegt. Nach Auftreten einer zytopathogenen Veränderung und positiver Reaktion der Kulturüberstände im HA-Test wurde die beschriebene Virusreinigung durchgeführt. Bei allen Versuchen wurden entsprechende Mock-Kontrollen, d.h. nicht infizierte Zellkulturen, mitgeführt.

10. Reinigung viraler DNS

Die dialysierten Viruslösungen wurden mit Natriumdodecylsulfat (SDS) in einer Endkonzentration von 1% für 20 min bei 37°C inkubiert. Festes CsCl wurde zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben, das SDS über 20 min im Eis ausgefällt, und durch Zentrifugation bei 3.000 upm und 0°C abgetrennt. Mit festem CsCl wurde die Lösung auf eine Dichte von 1.56 g/ml gebracht, und nach Zugabe von Äthidiumbromid im Dunkeln (Endkonzentration 0.2 mg/ml) bei 40.000 upm und 20°C im 50 Ti-Rotor ultrazentri-

fugiert (RADLOFF et al., 1967; TAI et al., 1972). Hierbei konnten die drei viralen DNS-Komponenten, kovalent geschlossene, zirkuläre DNS (Ko I), offene, zirkuläre DNS (Ko II) und lineare DNS (Ko III) voneinander getrennt werden (Abb. 3). Im UV-Licht zeigten sich zwei DNS-Äthidiumbromidbanden bei einer Dichte von 1.58 g/ml CsCl (Ko I) und 1.54 g/ml CsCl (Ko II und III), die getrennt gesammelt wurden. Das Äthidiumbromid wurde durch dreimaliges Ausschütteln mit Wasser-gesättigtem n-Butanol entfernt. Nach einer Extraktion mit Äther wurde dreimal gegen 2 l TE-Puffer bei 4°C dialysiert. Nach Messung im Spektralphotometer bei Wellenlängen von 220 - 320 nm konnte aus der Extinktion bei 260 nm die DNS-Konzentration nach der Gleichung $1 \text{ OD (optische Dichte)} = 0.05 \text{ mg DNS/ml}$ berechnet werden (FELSENFELD und HIRSCHMAN, 1965).

11. Präparation der Virusproteine

Die bei der DNS-Reinigung durch SDS-CsCl gefällten viralen Proteine wurden in 2 - 3 ml dest. Wasser aufgenommen und zweimal gegen 2 l dem. Wasser dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde quantitativ nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. 25 ml einer 2%-igen Na_2CO_3 -Lösung in 0.1 N NaOH wurden mit 0.125 ml einer 2%-igen CuSO_4 -Lösung und 0.125 ml einer 4%-igen Na-K-Tartrat-Lösung gemischt. Zu je 2.5 ml dieser Lösung kamen 0.23 ml 0.1 M Phosphatpuffer und 0.02 ml der Probenlösung. Als Nullwert wurde statt der Probe Phosphatpuffer eingesetzt. Diese Mischung blieb genau 10 min bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurden 0.25 ml Phenolreagenz nach FOLIN (1:1 mit 0.1 M PP gemischt) zupipettiert und für weitere 30 min stehen gelassen. Nach Messung der Extinktion bei 750 nm konnte an einer mit 50 µg und 100 µg Rinderserumalbumin hergestellten Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration abgelesen werden. 50 - 100 µg Protein wurden dann lyophilisiert und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

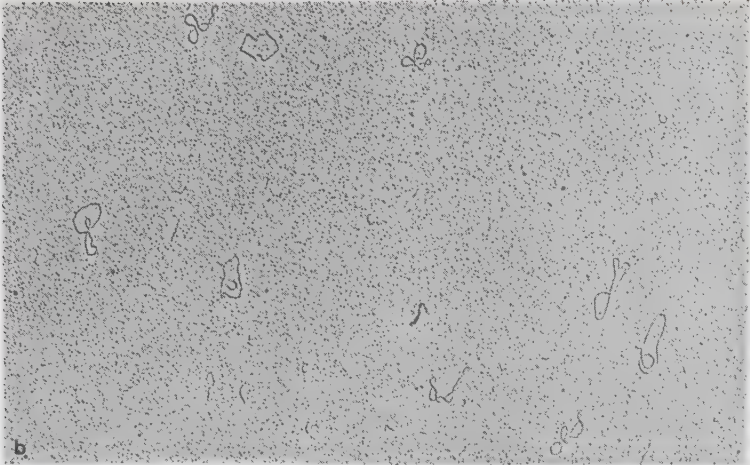
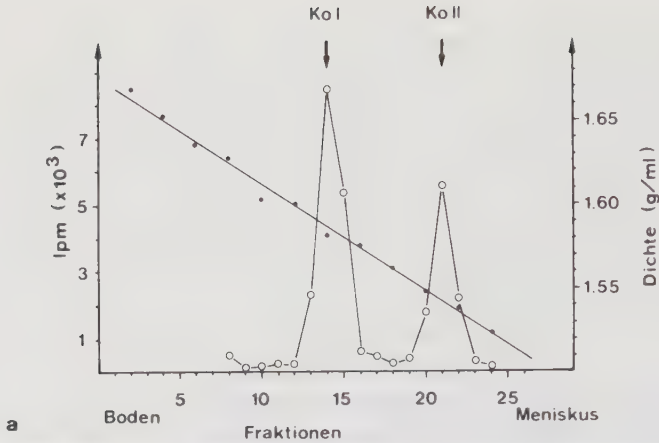


Abb. 3: Reinigung von BK Virus DNS. (a) Dichte ^3H -Thyminmarkierter DNS im CsCl-Ethidumbromidgradienten. (b) Elektronenmikroskopische Darstellung nach der Spreitungstechnik (EM-Vergrößerung X 10 000).

12. Plaque-Test (CASALS, 1967)

Zur Titration des BK Virus wurde auf HEL- und Verozellen in Plastikpetrischalen (Durchmesser 6 cm) ein Plaque-Test in halbfestem Medium durchgeführt. Nachdem die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen gebildet hatten, wurde mit Virus infiziert und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank in einer Atmosphäre von 5% CO₂ inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit warmem PBS wurden 3 ml eines erstarrenden Agarmediums (Agarose-Endkonzentration 0.9%) zugegeben und weiter im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das jeweils frisch hergestellte Agarmedium setzte sich zusammen aus gleichen Volumenteilen autklavierter, aufgekochter Agarose (1.8%) und MEM mit doppelter Aminosäuren- und Antibiotikakonzentration. Beide Anteile wurden bei einer Temperatur von 40°C zusammengemischt, und Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (10%) zugegeben. Nach jeweils einer Woche wurde mit 3 ml des gleichen Mediums gefüttert. Zur Ablesung der Plaques wurden 3 ml Medium, dem Neutralrot (2.5%) beigelegt worden waren, zugegeben, und über Nacht inkubiert.

13. Leukozytenpräparation (SCHNEIDER und ZUR HAUSEN, 1975)

Zum Anlegen von Leukozytenkulturen wurde von ca. 20 ml frischem menschlichem Nabelschnurblut ausgegangen, das heparinisiert war. Die Bestimmung des Hämatokritwerts wurde in einer 100 ml Glaskapillare mit einer Länge von 8 cm durchgeführt. Nach Aufziehen von 100 ml des Blutes wurde die Kapillare auf einer Seite zugeschmolzen und 3 min bei 3.000 upm zentrifugiert. Aus der Höhe der sedimentierten Erythrozyten konnte der Hämatokritwert berechnet werden. Anschließend wurde das Blut durch Verdünnen in RPMI-1640 Medium ohne Zusätze auf einen Hämatokritwert von 40% gebracht, und zu je 10 ml Blut 1 ml Siliziumcarbid (SiC) in PBS (200 mg/ml) zugemischt, auf Spritzen aufgezogen und 45 min bei 37°C unter langsamem Drehen inku-

biert. Die SiC-Lösung war vor Gebrauch über Nacht bei Zimmertemperatur mit 1 N HCl auf einer Nutsche gewaschen bis ein neutraler pH-Wert erreicht war. Danach wurde das SiC auf einer Aluminiumfolie ausgebreitet und im Vakuum autoklaviert. Nach Herstellung der Lösung von 200 mg/ml SiC in PBS wurde diese 10 sec mit 80 Watt beschallt, in kleinen Portionen abgefüllt und über 45 min bei 1 atü autoklaviert.

Nach Inkubation des Blutes mit der SiC-Lösung wurden die Spritzen über 10 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen und das überstehende Blut (lysierte Granulozyten) in sterile Plastikzentrifugenröhrchen überführt. Nach Verdünnung des Blutes mit dem gleichen Volumen RPMI-1640 wurden je 20 ml auf einen Ficoll-Ronpacon-Gradienten vorsichtig geschichtet (4.4 ml 75% Ronpacon, 10.6 ml Ficoll), und über 30 min bei Zimmertemperatur bei 1500 upm zentrifugiert. Die weiße, granulierten Bande, bestehend aus Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und ca. 10% Granulozyten, wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen RPMI-1640 verdünnt. Nach Zentrifugation bei 800 upm über 20 min wurde das Sediment mit 5 ml RPMI-1640 gewaschen und zentrifugiert, und in 5.5 ml RPMI-1640 aufgenommen. Danach wurde im Coulter counter die Zellzahl bestimmt und auf 2×10^6 Zellen/ml in MTP-Medium verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 0.05 ml in jedes Loch von Mikrotiterplatten mit flachem Boden gegeben. Anschließend wurde in MTP-Medium bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5% CO₂) inkubiert.

14. Nachweis viraler Antikörper

14.1. Hämagglutinationshemmtest (HHT)

Zum Nachweis BK virusspezifischer IgG Antikörper in Patientenserum wurde der HHT im Mikrotiterverfahren mit Einheitsvolumina von 0.025 ml durchgeführt (GARDNER et al., 1971). Als Antigen wurden 4 HAU/ml CsCl-gereinigtes BK Virus eingesetzt. Da menschliche Seren unspezifische Inhibitoren der Hämagglutination enthalten können, wurden in Vorversuchen an einer Reihe verschiedener Seren zwei Methoden zu deren Entfernung getestet.

Mit der Manganchlorid-Heparin Methode (FELDMANN, 1968; BONIN, 1973) wurden die Inhibitoren durch Zusatz von 0.05 ml MnCl_2 (0.1 M) und 0.05 ml Heparinlösung (5000 Einheiten/ml) zu 0.1 ml Serum während einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C ausgefällt.

In einer zweiten Testreihe wurden die gleichen Seren, wie beschrieben mit MnCl_2 -Heparin behandelt, zusätzlich aber noch eine halbe Stunde bei 56°C Hitze-inaktiviert, um thermolabile Inhibitoren zu zerstören.

Als drittes Verfahren wurde die RDE-Methode benutzt (MÄNTYJÄRVI et al., 1973). RDE (receptor destroying enzyme) ist ein aus *Vibrio cholerae* gewonnenes Enzym mit Neuraminidasewirkung, das ebenfalls Hämagglutinationshemmer zerstört. Die Seren wurden mit einer 1:5 verdünnten RDE-Lösung (100 Einheiten/ml) bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubiert, und anschließend eine Stunde bei 56°C Hitze-inaktiviert.

Zur Vermeidung unspezifischer Hämagglutination wurden anschließend 0.025 ml der vorbehandelten Seren mit 0.125 ml einer 2.5%-igen O-Erythrozytenlösung gemischt, und 20 min bei 4°C absorbiert. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten wurde eine geometrische Verdünnungsreihe der Testseren angelegt, Antigen zugesetzt und zum Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden in DGV verdünnte O-Erythrozyten (0.25%) zugetropft und im Kühlschrank 4-5 Stunden stehen gelassen. Nach Sedimentation der roten Blutkörperchen wurde abgelesen. Als Antikörpertiter wurde die Serumverdünnung gewertet, die noch eine vollständige Hemmung der Hämagglutination zeigte. Als Kontrollen wurden im Test eine Antigenrücktitration, eine Serumkontrolle ohne Antigenzusatz und eine Erythrozytenkontrolle mitgeführt. Sämtliche Verdünnungen waren mit DGV gemacht worden.

Diejenigen Seren, die nach der MnCl_2 -Heparin Methode, mit oder ohne Hitze-Inaktivierung, vorbehandelt worden waren, zeigten keine Titerunterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Seren. Die RDE-behandelten Seren dagegen ergaben in einigen

Fällen um 1 - 3 Stufen niedrigere Titer. Ansonsten waren die Titer gleich hoch. Deshalb wurden bei allen HHT-Tests die Seren nach der RDE-Methode behandelt.

14.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)

In diesem Test (SEVER et al., 1962) wurden komplementbindende Antikörper gegen BK Virus in den Patientenseren nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um ein zweistufiges Testverfahren. In der ersten Reaktion reagieren Antigen und Antikörper unter Zusatz von Komplement, was in der zweiten Reaktion, als Indikatorreaktion, sichtbar gemacht wird. Zu diesem Zweck wurde ein sogenanntes hämolytisches System benutzt, das sich aus Hammelerythrozyten und ein gegen diese gerichtetes Antiserum zusammensetzt. Im Falle einer positiven Primärreaktion wird Komplement verbraucht, das dann der zweiten Reaktion nicht mehr zur Verfügung steht, so daß keine Hämolyse der Hammelerythrozyten stattfindet.

Auch dieser Test wurde im Mikrotiterverfahren mit einem Einheitsvolumen von 0.025 ml durchgeführt. Als Antigen wurden 2 Einheiten BK Virus und 4 Einheiten Komplement eingesetzt. Alle zu testenden Seren wurden 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, um das Eigenkomplement zu zerstören. Sämtliche Verdünnungen wurden in Veronalpuffer angesetzt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung einer Inaktivierung des zugegebenen Komplements im Eis durchgeführt. Nach Anlegen der geometrischen Verdünnungsreihen und nach Zusatz von Antigen sowie Komplement wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Antigen-, Komplement-, Serum- und Indikatorsystemkontrollen wurden in jedem Test mitgeführt. Anschließend wurden die Testplatten und das frisch zubereitete hämolytische System für eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 0.05 ml des hämolytischen Systems wurden die Platten genau eine Stunde bei 37°C inkubiert, kurz zentrifugiert und abgelesen.

Die Verdünnung der Seren, die noch eine 50%-ige Hämolyse des Indikatorsystems ergab, wurde als Serumtiter gewertet.

14.3. Nachweis_BK_viruspezifischer_IgM-Antikörper

Zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen BK Virus im Serum wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewendet (VOGT, 1969). Verozellen wurden mit 5×10^3 HAU/ml BK Virus infiziert und bis zum Anzeichen erster zytopathogener Veränderungen kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 0.25% Trypsin behandelt, gut resuspendiert, auf sterile Objektträger verteilt und 1 - 2 Tage im CO₂-Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nachdem die Zellen gut angewachsen waren, wurde in PBS zweimal zehn Minuten gewaschen. Die Zellen wurden dann über drei Minuten mit einer 0.4%-igen KCl-Lösung behandelt und fünf Minuten in eisgekühltem Aceton fixiert. Durch die KCl-Behandlung wurde ein leichtes Aufquellen der Zellen erreicht, und die Diffusion der Antikörpermoleküle durch die Zellmembran erleichtert. (SCHMITZ et al., 1977). Nach Lufttrocknung wurden die Objektträger bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden mit den Testseren überschichtet, zwei Stunden in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert, zweimal zehn Minuten in PBS gewaschen und mit FITC-gekoppeltem Antiserum gegen menschliche IgM-Antikörper (1:10 in PBS verdünnt) eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurde wiederum in PBS gewaschen, die Objektträger wurden feucht in Elvanol eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop geprüft.

Zum Nachweis der Spezifität dieses Tests wurden außer der Verwendung verschiedener uninfizierter und mit verschiedenen Viren infizierter Zellen folgende Kontrolltests durchgeführt:

(1) Serumfraktionierung im Rohruckergradienten (BEST et al., 1969; LAUFS und FLECKENSTEIN, 1972). Zur Auftrennung der Immunglobuline des Typs G und M wurden 0.3 ml der Seren, die vorher mit O-Erythrozyten absorbiert worden waren, auf einen präformierten Rohruckergradienten (10-40% Rohrucker in PBS w/v) geschichtet und bei 36000 upm, 4°C über 18 Stunden im SW-41 Rotor zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden von

unten angestochen und zu Fraktionen von 0.2 ml ausgetropft. Nach Vermessen des Gradienten im Refraktometer wurden die einzelnen Fraktionen im HHT, der KBR, der Immunfluoreszenz und der Immundiffusion getestet.

(2) Blocktest. Verschiedene Testseren wurden mit BK Virus und Rötelnvirus absorbiert. Nach Austesten der optimalen Viruskonzentration wurden 2×10^3 HAU/ml BK Virus und Rötelnvirus mit 0.1 ml Serum für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die absorbierten Seren im Immunfluoreszenztest geprüft.

(3) 2-Mercaptoäthanolbehandlung. Zum Nachweis des Vorliegens von IgM-Antikörpern im Testserum wurde die Methode der Titerreduktion mit 2-Mercaptoäthanol (2-ME) durchgeführt (DEUTSCH und MORTON, 1957; BANATVALA et al., 1967). Die Seren wurden 1:5 in PBS vorverdünnt und mit 2-ME (Endkonzentration 0.2 M) eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle wurden die gleichen Seren außerdem statt mit 2-ME mit PBS inkubiert. Nach Auffüllen mit dem 15-fachen Volumen Aceton wurden die Seren 2 min ins Eis gestellt und bei 2000 upm zentrifugiert. Dies wurde dreimal wiederholt, die ausgefällten Proteine wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe getrocknet, und in 0.3 ml PBS gelöst. Die 2-ME-behandelten und die unbehandelten Seren wurden dann im HHT getestet. Eine Titerreduktion um 4 oder mehr Stufen nach 2-ME-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Seren wurde als Zeichen vorhandener IgM-Antikörper gewertet (FORGHANI et al., 1973).

(4) Protein A-Absorption. Zur Eliminierung der IgG-Antikörper aus den Testseren wurde an Sepharose gebundenes Protein A benutzt. Die IgM und die IgA-Antikörper bleiben unter diesen Bedingungen zurück. Dieses Protein ist Bestandteil der meisten Bakterienstämme von Staphylokokkus aureus (ANKERST et al., 1974), und hat die Fähigkeit Immunglobuline des Typs G außer der IgG-3 Fraktion zu binden. In Plastik-Eppendorfhütchen wurden jeweils 75 mg der Protein A-Sepharose in 1 ml PBS bei 4°C zum Aufquellen stehen gelassen. Danach wurde zentrifugiert, dreimal mit PBS gewaschen, und die Protein A-Sepharose mit

50 - 100 µl Serum gemischt. Es wurde eine Stunde bei 4°C geschüttelt. Das Serum wurde dann abzentrifugiert und im HHT, in der Immunfluoreszenz und in der Immundiffusion getestet.

(5) Latex - Agglutinationstest. Dieser Test wurde zum Nachweis eventuell im Serum vorliegender Rheumafaktoren durchgeführt (REIMER et al., 1975).

(6) Immundiffusion. Zum generellen Nachweis des Vorliegens von IgG und IgM-Antikörpern in den Testseren, beziehungsweise in den einzelnen Serumfraktionen nach Sedimentation im Rohrzuckergradienten, wurden käufliche Immundiffusionsplatten verwendet. Pro Loch der Testplatten wurden 0.02 ml des Testserums aufgetragen. Es wurde frühestens nach 6 Stunden (IgG) und 18 Stunden (IgM) abgelesen.

15. Nachweis viraler Antigene

Zur Darstellung intrazellulärer virusspezifischer Antigene wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewendet. Als Treffzellen wurden virusinfizierte Zellen verschiedener Linien benutzt, die auf Objektträgern ausgesät und fixiert wurden (s. 14.3).

15.1. Nachweis viraler Capsidantigene

Virale Capsidantigene (VCA) wurden in Vero- und HEL-Zellen nachgewiesen, die mit $2 - 5 \times 10^3$ HAU/ml BK Virus infiziert waren. Als Antiserum diente ein Patientenserum, das im HHT einen Antikörpertiter gegen BK Virus von 1:1280 hatte. Dieses wurde auf die Objektträger überschichtet, 1 Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen über 10 min in PBS wurden die Zellen für 2 Stunden mit einem FITC-gekoppelten Antiserum gegen menschliches Gammaglobulin inkubiert. Danach wurden die Objektträger wiederum in PBS gewaschen, feucht in Elvanol eingebettet, und im Fluoreszenzmikroskop geprüft.

15.2. T-Antigennachweis

Mittels der direkten Immunfluoreszenz wurde in BK virusinfizierten Zellen der Nachweis des virusspezifischen Tumorantigens (T-Antigen) durchgeführt. Als Antiserum diente ein SV 40-T-Antigen-Antiserum, gekoppelt mit FITC, das Frau Dr. K. Dörrjes, Institut für Virologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt hatte. Nach Inkubation über 2 Stunden bei 37°C wurden die Objektträger in PBS gewaschen und eingebettet.

16. Elektronenmikroskopische Präparationen

16.1. Negativkontrastierung

Die Darstellung der Viruspartikel im Elektronenmikroskop erfolgte nach der Methode der Negativkontrastierung (VALENTINE et al., 1968). Auf die Viruslösung wurde ein dünner Kohlefilm, der vorher auf Glimmer aufgedampft worden war, flottiert, auf eine 2%-ige Phosphorwolframsäurelösung (pH 7.0) überführt, und nach 2-3 Minuten mit einem Neopren-beschichteten Kupfernnetzchen aufgefangen und auf Filterpapier getrocknet. Bei manchen Proben mit geringer Viruskonzentration wurde die Probenlösung direkt auf ein mit Parlodium und Kohle beschichtetes Kupfernnetzchen gebracht, kurz antrocknen gelassen, und ein Tropfen Phosphorwolframsäure zugegeben, der mit einem Filterpapier dann seitlich abgezogen wurde.

16.2. Darstellung viraler DNS

16.2.1. Mikrodiffusionstechnik

Zur Darstellung viraler DNS im Elektronenmikroskop wurde die Mikrodiffusionsmethode nach LANG und MITANI (1970), modifiziert nach BORNKAMM et al. (1976) ohne Formaldehyd durchgeführt. 100 ng/ml DNS wurden mit 50 µl 0.2 M Ammoniumacetat, 0.0027% Cytochrom C, 0.1 M EDTA gemischt, und ein Tropfen auf eine Plastikoberfläche gegeben. Nach 45 bis 60 Minuten wurde der Protein-DNS-Tropfen mit einem Parlodium-beschichteten Kupfernnetzchen aufgetupft und 30 Sekunden mit Uranylacetat (0.0044% in 90%-igem Äthanol) kontrastiert. Nach Trocknen an der Luft

wurde unter Rotation mit einem Winkel von 7° bei 2×10^{-5} Torr mit Pt/Pd bedampft.

16.2.2. Spreitungstechnik

Als zweite Präparationsmethode zur Darstellung viraler DNS wurde die Spreitungstechnik benutzt (DAVIS et al., 1971). 10 μ l der DNS-Lösung (500 ng/ml) in 0.05 M Tris-HCl pH 8.1, 0.005 M EDTA, 60% Formamid und 0.0075% Cytochrom C wurden auf einer Lösung aus 10% Formamid, 0.01 M Tris-HCl pH 8.1 und 0.001 M EDTA gespreitet. Durch die Denaturierung des Proteins auf der Hypophasenoberfläche, sichtbar gemacht durch etwas Talkumpulver, wurde die DNS gespreitet. Nach Auffangen der DNS mit einem Parlodium-beschichteten Kupfernnetzchen wurde 30 Sekunden in Uranylacetat kontrastiert und rotationsbedampft, wie oben beschrieben.

16.3. Präparation von Ultradünnschnitten

Zur Untersuchung des Biopsiematerials im Elektronenmikroskop wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Ein kleines Stück des bei -70°C weggefrorenen Materials wurde über drei Tage in einer 3%igen Glutaraldehydlösung belassen, dann in Millong-Puffer gewaschen (ca. 30 min unter Schütteln), und schließlich eine Stunde bei Zimmertemperatur in 1% Osmiumsäure (gelöst in Millong-Puffer, w/v) fixiert. Zum Entwässern wurde dann die Probe nacheinander für jeweils 10 min in 50%, 75% und 95% Aceton geschüttelt. Danach wurde noch dreimal 10 min in wasserfreiem Aceton und zweimal in Propylen geschüttelt. Das Einbetten der Probe erfolgte in verschiedenen Schritten: jeweils 30 min bei 50°C in Durcupan I, 1:3 in Propylen, 2:2 und 3:1 in Propylen gemischt, dann zweimal eine Stunde bei 50°C in Durcupan I und einmal eine Stunde bei 50°C in Durcupan II. Danach wurde die Probe zusammen mit Durcupan II in Gelatine-kapseln abgefüllt und drei Tage bei 60°C polymerisieren gelassen. Die Ultradünnschnitte wurden am Mikrotom auf einer Wasseroberfläche durchgeführt, mit Toluol gespreitet und mit einem Kupfernnetzchen aufgefangen. Die Kontrastierung der

Präparate wurde während 20 - 30 min in einer mit 50%igem Alkohol gesättigten Uranylacetatlösung bei Zimmertemperatur im Dunkeln durchgeführt. Anschließend wurde mit 50% Äthanol gewaschen und die Präparate 20 - 30 min auf den Tropfen einer Bleicitratlösung (s. 3) belassen. Nach dreimaligem Waschen mit frisch destilliertem Wasser und Trocknen für ca. eine Stunde an Luft konnten die Präparate im Elektronenmikroskop betrachtet werden.

16.4. Immunoelektronenmikroskopie

Zum direkten Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion von Patientenserum und BK Virus, bzw. verschiedenen Virusisolaten und einem Patientenserum, wurde die Methode der elektronenmikroskopischen Agglutination durchgeführt (GALLNER et al., 1971). Als Antigen wurden 1×10^3 HAU/0.05 ml CsCl-gereinigtes Virus (10 μ l) eingesetzt, dem 0.05 ml 10 mM $MgCl_2$ beigelegt worden waren. Dazu wurden 10 μ l eines 1:5 in PBS verdünnten Patientensera gegeben, das BK virusspezifische Antikörper besaß und eine Stunde bei Zimmertemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Negativkontrastierung (s. 16.1) wurde im Elektronenmikroskop auf Agglutination der Viruspartikel geprüft. Zum Vergleich wurde jeweils eine Kontrolle mitgeführt, die statt Serum PBS enthielt.

17. Spaltung viraler DNS mit Restriktionsenzymen

300 bis 500 ng viraler DNS wurden mit 1 bis 20 μ l der verschiedenen Restriktionsendonukleasen in folgendem Reaktionspuffer gespalten: 0.001 M Tris-HCl pH 7.5, 0.006 M $MgCl_2$, 0.006 M 2-ME, 0.015 M KCl. Die Inkubationszeiten betrugen 6 oder 18 Stunden bei 30°C oder 37°C, je nach eingesetztem Enzym. Durch Zugabe von 0.5 M EDTA wurde die Reaktion beendet. Die Proteine wurden durch Ausschütteln im gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24 + 1) entfernt, und die DNS-Fragmente im dreifachen Volumen absoluten Äthanol bei einer Konzentration von 0.21 M Natriumacetat für mindestens zwei Stunden bei -20°C

präzipitiert, und im SW 56 Rotor bei 0°C und 35000 upm über 45 Minuten abzentrifugiert. Nach Aufnahme des Präzipitats in 10 µl Elektrophoresepuffer und Zugabe von 10 µl 20% Rohrzucker und 0.06% Bromphenolblau wurden die Proben der Gelelektrophorese unterworfen.

18. Gelelektrophorese viraler DNS-Fragmente

Die virale DNS wurde je nach Größe der Fragmente in folgenden Gelen aufgetrennt:

- (a) 0.8% bzw. 1%-ige Agarosegele (18 X 12 X 0.3 cm). Die Agarose wurde durch Kochen während 30 Minuten gelöst, bei einer Temperatur von 50°C gegossen und bis zum Erstarren des Gels bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einem Vorlauf bei 20 bis 50 V wurde der Elektrophoresepuffer gewechselt, die Proben aufgetragen und fünf Minuten bei 100 V an der oberen Grenze des Gels gesammelt. Unter Wasserkühlung erfolgte die Elektrophorese bei 24 V.
- (b) 4 oder 8%-ige Polyacrylamid-Gele (18 X 12 X 0.1 cm, 0.2% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.1% N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin). Durch Zugabe von 0.25% Ammoniumpersulfat wurde die Polymerisation des Acrylamids erreicht. Nach einem Vorlauf bei 100 V wurde der Elektrophoresepuffer gewechselt, die Proben aufgetragen und bei 20 V gesammelt. Unter Wasserkühlung erfolgte die Elektrophorese bei 100 V.

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs wurden die Gele für eine halbe Stunde in 5 µg/ml Äthidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) mit einer Polaroid-Landkamera fotografiert.

19. Bestimmung der Molekulargewichte der DNS-Fragmente

Die Molekulargewichte der DNS-Fragmente wurden mittels DNS bekannter Größe bestimmt. Als Marker wurden die R'Hind III-Fragmente von PM-2 DNS eingesetzt. Ihre Molekulargewichte betragen 3.5, 1.3, 0.6, 0.29, 0.28, 0.17 und 0.065 x 10⁶ d

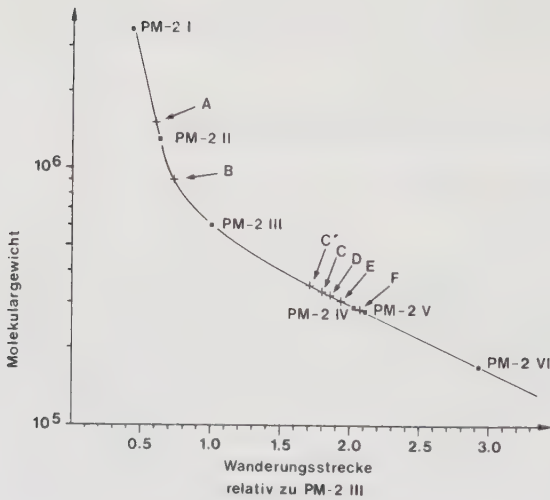


Abb. 4: Molekulargewichtsbestimmung der BK Virus DNS-Fragmente nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Hind II/III.

(STREEK, pers. Mitteilung). Die Wanderungsstrecken der einzelnen Fragmente wurden gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Die Wanderungsstrecken wurden relativ zum Fragment PM-2 III (0.6×10^6 d) aufgetragen. Die Molekulargewichtsbestimmung der BK Virus-DNS Fragmente nach Spaltung mit Hind II/III ist in Abbildung 4 gezeigt.

20. Gelelektrophorese viraler Proteine (SHAPIRO et al., 1967)

Die lyophilisierten Proteinproben wurden in 0.05 ml eines Puffers aufgenommen, der 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 8 M Urea, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoäthanol, 0.001 M EDTA und 0.05% Bromphenolblau enthielt, und zur Proteindissoziation 5 min ins kochende Wasser gestellt. Anschließend wurde auf Polyacrylamidgele aufgetragen. Im Sammelgel (3% Acrylamid, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.001 M EDTA, 0.1% SDS, 0.05% TEMED und 0.1% Ammoniumpersulfat) wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 40 V an der Grenze zum Trenngel konzentriert. Im Trenngel (8% oder 12% Acrylamid, 0.375 Tris-HCl pH 8.8, 0.001 M EDTA, 0.1% SDS, 0.26% TEMED, 0.1% Ammoniumpersulfat) wurden sie dann nach Molekülegröße und elektrischer Leitfähigkeit bei einer konstanten Spannung von 7.5 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 12.5% Trichloressigsäure für eine halbe Stunde bei 60°C fixiert und in einer 0.25%igen Coomassielösung in 7%iger Essigsäure während 2 Stunden bei 60°C gefärbt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde in 7%iger Essigsäure entfärbt. Die Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine erfolgte nach der Methode von WEBER und OSBORN (1969). Als Eichproteine wurde Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, und Cytochrom C verwendet. Zur densitometrischen Auswertung wurden die einzelnen Bahnen des Gels ausgeschnitten, und im Spektralphotometer mit automatischem Gel-Scanner bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen.

21. Extraktion zellulärer DNS

Zur Extraktion zellulärer DNS aus Biopsiematerial wurde die Methode der Phenolextraktion angewendet (ZUR HAUSEN et al., 1970). Ein Stück des Tumormaterials wurde mit reinem Seesand gut im Mörser zerrieben und in 5 ml 0.01 M Tris/0.001 M EDTA resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 2.000 upm, 4°C während 10 min wurde der Überstand zum Versuch einer Virusreinigung aufgehoben, das Sediment im gleichen Volumen PBS und im halben Volumen Sarkosylpuffer (0.075 M Tris, 0.025 M EDTA, 3% Sarkosyl, pH 8.0) aufgenommen und für 10 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde mit Proteinase K-Lösung (ein Viertel Volumen 0.5 mg/ml) zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach dem Proteinase-Verdau wurde das gleiche Volumen einer mit 0.05 M Tris/0.005 M EDTA - gesättigten Phenollösung (pH 7.1) 10 min geschüttelt, 10 min im Eis stehen gelassen und schließlich 10 min bei 2.000 upm bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Diese Phenolextraktion wurde noch 2 - 3mal wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war. Daraufhin wurde gegen TE-Puffer zwei Tage dialysiert, wobei die Dialyseflüssigkeit ca. alle 4 Stunden gewechselt wurde. Nach der Dialyse schloß sich ein RNaseverdau (0.02 mg/ml RNase, 30 min bei 80°C vorinkubiert) über eine Stunde bei 37°C an. Nach erneuter Phenolextraktion wurde wieder gegen TE-Puffer dialysiert, und die Extinktion im Spektralphotometer bei Wellenlängen von 220 - 320 nm gemessen, um auf die vorliegende DNS-Konzentration schließen zu können.

22. In vitro Markierung viraler DNS

Gereinigte BK Virus DNS wurde mit der sogenannten 'nick repair'-Methode (NONOYAMA und PAGANO, 1973) radioaktiv markiert. 2.5 µg BK Virus DNS wurden in einer Lösung aus 0.05 M Tris-HCl pH 7.4, 0.007 M $MgCl_2$, 0.001 M 2-ME aufgenommen und mit 0.05 µg DNase über 15 Minuten bei 37°C angedaut. Nach Zugabe von 0.15 M KCl wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C

über 10 min inaktiviert und anschließend ins Eis gestellt. Die durch die DNase gesetzten Einzelstrangbrüche der DNS wurden anschließend mit 2.5 Einheiten DNS-Polymerase (Kornberg Enzym) in Anwesenheit von 10 nM ^3H -dTTP (spezifische Aktivität 50 Ci/mM), 100 nM dATP, dCTP und dGTP bei 17°C für 2.5 Stunden repariert. Anschließend wurde mit 750 ml Tris-HCL-gesättigtem Phenol zur Proteindenaturierung extrahiert und die DNS über Sephadex G-50 von den Nukleotiden getrennt. Als Elutionspuffer diente 0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.001 M EDTA, 0.1% Sarkosyl. Es wurden Fraktionen zu 10 Tropfen gesammelt und die einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler gezählt. Die Fraktionen der radioaktiv-markierten DNS wurden vereinigt und in kleinen Portionen zu 0.05 ml bei -70°C aufbewahrt.

23. DNS-DNS Hybridisierung

Der Nachweis viraler Genomäquivalente in zellulärer DNS verschiedener Tumoren wurde durch DNS-DNS Hybridisierung in Lösung und Bestimmung der Reassoziationskinetik geführt (FLECKENSTEIN et al., 1978). ^3H -markierte BK Virus-DNS (1 ng/ml) wurde zusammen mit lyophilisierter Lachssperma-DNS (1 mg) oder der zu testenden zellulären DNS (1 mg) in 1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.05% Sarkosyl gelöst und durch 10-minütiges Kochen in 0.25 N NaOH fragmentiert. Nach Abkühlen der Proben in Eiswasser wurde mit 2 N HCl, 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 neutralisiert. Die Hybridisierung wurde im Wasserbad bei 65°C über sechs Stunden durchgeführt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Aliquot von 50 µl jeder Probe entnommen, mit 0.5 ml eisgekühltem 0.14 M Natriumphosphatpuffer (äquimolare Teile an Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 , pH 6.8) verdünnt und bis zur Hydroxyapatit-Chromatographie in 1 ml Säulen bei 0°C stehen gelassen. Einzelsträngige DNS wurde mit insgesamt 3 ml 0.14 M Natriumphosphatpuffer und 0.4% SDS bei 60°C eluiert, doppelsträngige DNS bei der gleichen Temperatur mit insgesamt 1.5 ml 0.4 M Natriumphosphatpuffer und 0.4% SDS. Die Eluate wurden in einem Endvolumen von 4 ml auf die gleichen Phosphat- und SDS-

Konzentrationen gebracht, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt, geliert und bei 4°C im Szintillationszähler gemessen.

Die erhaltenen Ipm-Werte für doppelsträngige und einzelsträngige DNS wurden addiert und der Prozentsatz an einzelsträngiger DNS berechnet. Der Kehrwert dieses Prozentsatzes entspricht dem Verhältnis einzelsträngiger DNS zum Zeitpunkt 0 zu einzelsträngiger DNS zum Zeitpunkt t (C_0/C_t). Bei einer Kinetik 2. Ordnung erhält man beim Auftragen der C_0/C_t -Werte gegen die Zeit eine Gerade (WETMUR und DAVIDSON, 1968). Die Steigungen dieser Geraden sind proportional der Konzentration an virusspezifischen Sequenzen. Somit lassen sich aus dem Verhältnis des Tangens der Gerade der Proben-DNS zum Tangens der als Standard mitgeführten BK Virus-DNS die Konzentration an viraler DNS in der Proben-DNS bestimmen.

24. Abkürzungen

Ci	Curie
DEAE	Diäthylaminoäthyl
EDTA	Äthylendiamintetra-acetat
FITC	Fluorescein-iso-thiocyanat
Ipm	Impulse pro Minute
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-Bis (5-phenyloxazolyl-2(2))-benzol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat

C. ERGEBNISSE

1. Virusvermehrung und Kultivierungsbedingungen

Vom Zeitpunkt der Inokulation des BK Virus in permissive Zellen bis zum Auftreten einer zytopathogenen Veränderung des Virus und der Virusvermehrung können Wochen bis Monate verstreichen. Deshalb wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet, um eine optimale Virusproduktion so bald wie möglich nach der Infektion zu erhalten. Bei allen Versuchen, die im Folgenden beschrieben sind, wurden zur Kontrolle sogenannte Mock-Kontrollen, nicht-infizierte Zellkulturen, gleichzeitig mitgeführt.

1.1. Einfluß der Virusmultiplizität

Als erstes wurde die Frage untersucht, wie sich verschiedene inokulierte Viruskonzentrationen auf die Virusproduktion auswirkten. Dazu wurden Verozellen mit BK Virus-Prototyp, der auf diesen Zellen angezüchtet worden war, in verschiedenen Konzentrationen infiziert, ausgedrückt in den HA-Titern einer Virusstammlösung. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse mit den getesteten Virusverdünnungen, die einen HA-Titer von 1:8 (1.5×10^2 HAU/ml), 1:16 (3×10^2 HAU/ml), 1:128 (2.5×10^3 HAU/ml), 1:256 (5×10^3 HAU/ml) und 1:1024 (20×10^3 HAU/ml) hatten. Man sieht, daß, gemessen an den HA-Titern der Kulturüberstände, zwar mit der größten Viruskonzentration (20×10^3 HAU/ml) am ehesten die Virusvermehrung gefördert wurde, die Gesamtausbeute an infektiösem Virus jedoch nicht diejenige überstieg, die mit einer niederen Viruskonzentration (2.5×10^3 HAU/ml) erreicht wurde. Bei geringeren Mengen an infizierendem Virus war dann auch die Virusausbeute geringer, beziehungsweise konnte zumindest im HA-Test kein neu gebildetes Virus mehr nachgewiesen werden.

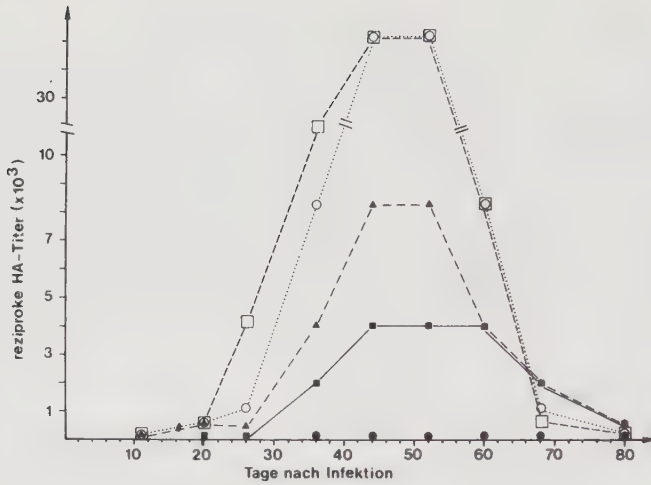


Abb. 5: Einfluß der Virusmultiplizität auf die BK Virus-replikation in Verozellen. Inokulation mit 1.5×10^2 HAU/ml ●—●, 3×10^2 HAU/ml ■—■, 2.5×10^3 HAU/ml ○····○, 5×10^3 HAU/ml ▲—▲, 20×10^3 HAU/ml □---□. Die Zellen waren am 8. und 20. Tag nach der Infektion subkultiviert worden.

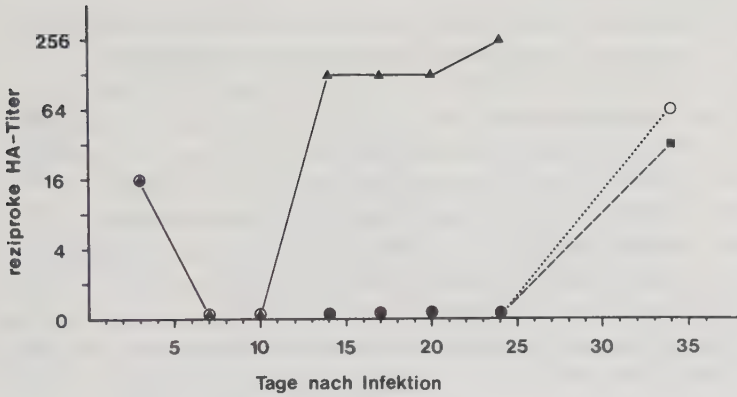


Abb. 6: BK Virusvermehrung in Verozellen bei verschiedenen Temperaturen: ■---■ 30°C, o...o 34°C, ▲—▲ 37°C.

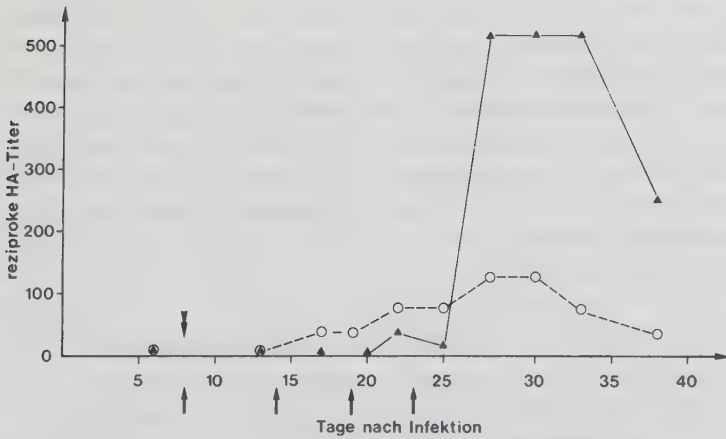


Abb. 7: Einfluß der Subkultivierung von Verozellen auf die BK Virusvermehrung. Häufig subkultiviert ▲—▲, einmal subkultiviert o---o. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Subkultivierung.

1.2. Temperaturoptimum

Um herauszufinden, bei welcher Inkubationstemperatur sich BK Virus am besten in permissiven Zellen vermehrt, wurden Verozellen mit 2.5×10^3 HAU/ml Virus infiziert, und bei verschiedenen Temperaturen kultiviert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Daraus geht deutlich hervor, daß die Virusvermehrung bei einer Temperatur von 37°C am ehesten eintritt, wie es in der HA-Reaktion der Kulturüberstände angezeigt wurde. Nicht in der Abbildung dargestellt sind die negativen Ergebnisse bei Temperaturen von 28°C und 25°C (Raumtemperatur) nach 34 Tagen. Die HA-Titer der am vierten Tag nach der Infektion getesteten Kulturüberstände lassen sich mit der Viruseingabe zum Zeitpunkt der Infektion erklären.

1.3. Einfluß der Häufigkeit der Subkultivierung

Schließlich wurden Versuche durchgeführt, die Aufschluß über einen Zusammenhang von der Virusvermehrung mit dem Zellwachstum geben sollten. Hierzu wurden Verozellen mit BK Virus infiziert (2.5×10^3 HAU/ml) und bei 37°C kultiviert. Eine Testreihe wurde nur einmal, am 10. Tag gesplittet, d.h. trypsiniert und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt, (Abb. 7, o--o), während eine zweite Testreihe insgesamt viermal im Abstand von vier, bzw. fünf Tagen subkultiviert wurde (Abb. 7, ▲—▲), jeweils nachdem sich ein zusammenhängender Zellrasen ausgebildet hatte. Wie in Abbildung 7 gezeigt, wurde die BK Virusproduktion deutlich gefördert, wenn die Gewebekulturzellen sich in der Wachstumsphase befanden, was eben durch das häufigere Subkultivieren erreicht wurde.

1.4. Virusproduktion in verschiedenen Gewebekulturzellen

Nach Austesten der für eine BK Virusvermehrung günstigsten Kultivierungsbedingungen, wurden verschiedene Gewebekulturzellen auf ihre Permissivität getestet. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der BK Virusinfektion verschiedener Zellen. Alle Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen bei 37°C kultiviert, und waren mit einer Viruskonzentration von 2.5×10^3 HAU/ml infiziert.

Zellen	Inkubations- zeit	CPE ⁺	HA-Titer Überstand	VCA- Fluoreszenz
Vero	2 Wochen	++	1: 64	+++
Rita	8 "	-	-	-
OMK	6 "	-	-	n.t. *)
CV-1	6 "	-	-	n.t.
HEL	4 "	++	1: 32	+++
HEK	5 "	++	1: 64	+++
HSF	4 "	++	1: 64	+++
HEB	3 "	++	1:128	+++

Tabelle 1: BK Virusinfektion verschiedener Gewebekulturzellen.

⁺CPE: zytopathogener Effekt

*) n.t.: nicht getestet

Verozellen erwiesen sich am empfänglichsten für eine BK Virusinfektion. Schon nach zwei Wochen waren im Lichtmikroskop deutliche Anzeichen eines zytopathogenen Effekts sichtbar, und der HA-Test der Kulturüberstände war positiv. Allerdings zeigten sich bei der weiteren Subkultivierung mit gleicher Virusmultiplizität deutliche Schwankungen im zeitlichen Auftreten der zytopathogenen Veränderungen. Oftmals konnten erst nach 3 - 4 Wochen Virus-bedingte Zellveränderungen beobachtet und Virus im Kulturüberstand im HA-Test nachgewiesen werden. In den drei anderen Affenzelllinien (Rita, OMK und CV-1) konnte keine Virusproduktion nach der getesteten Inkubationszeit festgestellt werden. Alle untersuchten menschlichen Gewebekulturzellen waren permissiv und zeigten nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5 Wochen Virusproduktion.

Zeichen einer zytopathogenen Veränderung des Virus in den infizierten Zellen waren anfängliche Vakuolisierung, Abrundung

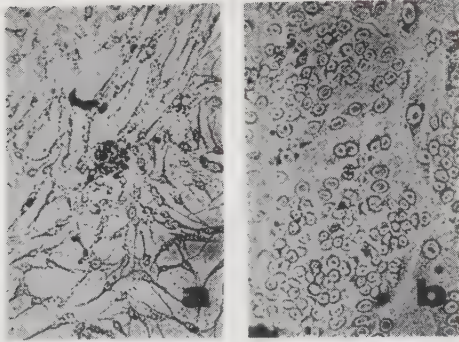


Abb. 8: (a) Zytopathogener Effekt in BK Virus-infizierten Verozellen 3 Wochen nach der Infektion. (b) Nicht-infizierte Verozellen.

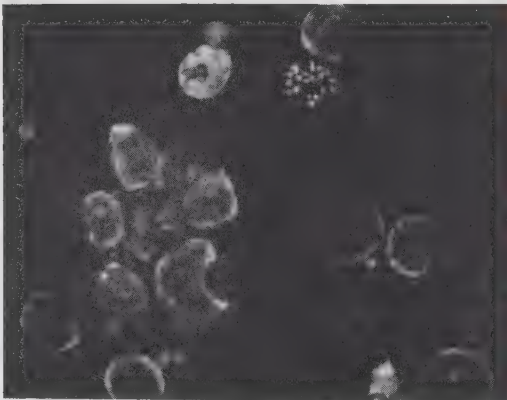


Abb. 9: VCA-Fluoreszenz in Verozellen 2 Wochen nach der Infektion mit BKV.

und Vergrößerung einzelner Zellen im Zellverband. Mit zunehmender Virusproduktion zeigten sich Degenerationerscheinungen des gesamten Zellrasens (Abb. 8). Zu diesem Zeitpunkt wurden die im Zellkern neugebildeten und zusammengesetzten Viruspartikel in das Zytoplasma geschleust, was mit einem Zerfall der Zellkerne einherging (LECATSAS et al., 1974; MARALDI et al., 1975). Danach wurden die Virionen in den Zellkulturüberstand freigesetzt, wobei die gesamten Zellen nach und nach zerstört wurden.

2. Gewebekulturnachweis

Zum Nachweis des BK Virus, bzw. dessen Produktion in Gewebekulturzellen, ließ sich der unter 7. beschriebene HA-Test anwenden, der jedoch einige Nachteile hatte. Zum einen mußte in jedem Fall die langsam fortschreitende Virusvermehrung und Freisetzung der Virionen in den Kulturüberstand abgewartet werden. Hinzu kam die relative Unempfindlichkeit dieses Tests, für den eine gewisse Viruskonzentration vorhanden sein mußte, um eine HA-Reaktion sichtbar zu machen. Zum anderen handelte es sich dabei nur um eine grobe Titrationsmethode infektiöser Viruspartikel.

2.1. Koinfektionsversuche

Um nun den Virusnachweis zu beschleunigen und ein bequemes Titrationsverfahren zu erhalten, wurden Versuche durchgeführt, bei welchen gleichzeitig mit BK Virus und menschenpathogenen Adenoviren infiziert wurde. Solche Adenoviren vermehren sich nur produktiv in menschlichen Zellen, nicht aber in Affenzellkulturen. Von dem Papovavirus SV 40 weiß man, daß es eine Helferfunktion ausüben kann, die Adenoviren in Affenzellen zur produktiven Vermehrung befähigt (RABSON et al., 1964; O'CONOR et al., 1965). Unter der Annahme, daß BK Virus ebenfalls eine solche Helferfunktion für Adenoviren besitzen könnte, wurde dieses System der Koinfektion angewendet.

Ein im Institut vorhandener Adenovirus Typ 12-Stamm wurde in KB-Zellen angezüchtet und austitriert. Zwei Adenovirusverdünnungen (5 PFU/ml und 20 PFU/ml) wurden zur gleichzeitigen Infektion mit 0.3×10^3 HAU/ml BK Virus von Verozellen benutzt. Nach zwei Wochen ergaben sich im Falle der Adenoviruslösung mit 20 PFU/ml deutliche zytopathogene Veränderungen, sowohl bei den koinfizierten Verozellen, als auch bei der mitgeführten Kontrolle nur-Adeno-infizierter Verozellen. BK Virus-infizierte Verozellen und Mock-Kontrollen dagegen waren negativ. In allen Fällen war der HA-Test der einzelnen Zellkulturüberstände negativ. Die Testserie mit der zweiten Adenoviruslösung (5 PFU/ml) blieb sowohl im Fall der Koinfektion, als auch der Kontrollen hinsichtlich zytopathogener Zellveränderungen und des HA-Nachweises noch nach vier Wochen negativ.

2.2. Plaque-Tests

Im Folgenden wurden Koinfektionsversuche mit einem Adenovirus Type 2-Stamm durchgeführt, der sich in Verozellen nicht produktiv vermehrt (im Institut von Frau G. Werner getestet). Im Prinzip wurden die gleichen Experimente ausgeführt, wie unter 2.1. beschrieben. Allerdings wurde die Kultivierung nach Infektion der Verozellen im halbfesten Agarmedium als Plaque-Tests weitergeführt. Es wurden von einer BK Virus-Stammlösung Verdünnungen mit 80×10^3 , 40×10^3 , 8×10^3 , 1.6×10^3 , 0.8×10^3 und 0.16×10^3 HAU/ml Viruskonzentration und eine konstante Adenoviruskonzentration (21 µg/ml) eingesetzt. Auch bei diesen Koinfektionsversuchen konnte nie eine Helferfunktion des BK Virus auf die Vermehrung des Adenovirus gezeigt werden.

Schließlich wurden neben den bisher beschriebenen Versuchen weitere Plaque Tests auf Verozellen und HEL-Zellen, die mit verschiedenen BK Viruskonzentrationen infiziert worden waren, gemacht. Zum einen sollte versucht werden, BK Virusbösungen direkt in diesem System zu titrieren. Zum anderen hätten aus den einzelnen Plaques genetisch einheitliche Viruskclone

isoliert werden können. Alle diese Versuche schlugen jedoch fehl. Im besten Fall konnten die Zellen unter den beschriebenen Bedingungen 5 Wochen gehalten werden, bevor diese, ohne Zeichen einer Plaquebildung, eingingen.

3. Infektion menschlicher Leukozyten

Menschliche Leukozyten (1.2×10^6 Zellen/0.1 ml), gewonnen aus dem Nabelschnurblut gesunder Spender, wurden mit zwei Konzentrationen eines BK Virus-infizierten Verozellüberstands infiziert (80×10^3 und 2.5×10^3 HAU/ml) und bei 37°C in 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Nach 12 Tagen zeigten die infizierten Leukozytenkulturen gegenüber den Mock-Kulturen deutliche Veränderungen. Die Zellen lagerten sich klumpenartig an mehreren Stellen zusammen. Diese Haufenbildung schritt in den weiteren Tagen langsam fort, bis 30 Tage nach Infektion die Zellen der infizierten und nichtinfizierten Kulturen abgestorben waren. Die Kulturüberstände blieben jedoch im HA-Test negativ. Da es sich bei der Inokulationslösung um infektiösen Zellkulturüberstand gehandelt hatte, konnte man nicht sicher sein, ob die Zellveränderungen die Folge eines virusspezifischen Effekts waren. In der Orceinfärbung, als Schnelltest zum Nachweis von Mycoplasmen, waren die verwendeten Verozellen positiv. Deshalb wurden die Versuche unter gleichen Bedingungen mit BK Virus wiederholt, das vorher über CsCl -Gradienten gereinigt worden war. Hierbei gelang es nicht, die beschriebenen Ergebnisse zu reproduzieren. Nach spätestens drei Wochen waren die Leukozytenkulturen ohne signifikante Zellveränderung abgestorben.

4. Virusspezifische Antigene

Mittels der Methode der indirekten Immunfluoreszenz an fixierten, infizierten Treffzellen wurde das Auftreten zweier virusspezifischer Antigene bestimmt. Durch Fixieren der Zellen in Aceton wurde die Zellmembran für Antikörpermoleküle

durchlässig gemacht, wodurch intrazelluläre Antigene nachweisbar wurden.

4.1. Virale Capsid-Antigene

Die viralen Capsid-Antigene (VCA), auch V (Virion)-Antigene genannt, sind auf Grund der Virusvermehrung und Virusreifung im Zellkern lokalisiert. Diese können nur in lytisch infizierten Zellen nachgewiesen werden. Von SV 40 weiß man, daß diese zwischen 20 und 40 Stunden nach der Infektion auftreten, und durch Inhibitoren der Protein- und DNS-Synthese gehemmt werden können (SALZMAN und KHOURY, 1974).

Verozellen wurden mit 40 HAU/ml BK Virus und den verschiedenen Virusisolaten infiziert und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion fixiert. Die Objektträger wurden nach der Färbereaktion im Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein fluoreszierender Zellkerne geprüft. Pro Objektträger wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt, um den Prozentsatz gefärbter Zellkerne bestimmen zu können. Gleichzeitig durchgeführte Kontrolltests mit SV 40-infizierten Ritazellen, Cytomegalovirus-infizierten HEL-Zellen und nichtinfizierten Verozellen zeigten nie die typische nukleäre Fluoreszenz (Abb. 9). Wie in Abbildung 10 dargestellt (●—●), zeigten frühestens vier Tage nach Infektion einzelne Zellkerne (1%) eine schwache Färbung. Die Intensität und die Anzahl fluoreszierender Zellkerne nahm im weiteren Verlauf zu und erreichte 10 Tage nach der Infektion ein Maximum (ca. 70%). Tests mit Zellen, die 3 - 4 Wochen mit BK Virus infiziert waren, ergaben eine Verminderung der Fluoreszenzreaktion. Die Zellkerne, und zum Teil auch die Zellen, waren größtenteils degeneriert. Es zeigte sich dann vor allem eine diffus verteilte, granuliert erscheinende Fluoreszenz, die meist die gesamte Zelle betraf.

4.2. T--Antigen

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, daß SV 40-transformierte Zellen, SV 40-induzierte Tumorzellen und auch lytisch infizierte Zellen ein nukleäres Antigen synthetisieren, das als T

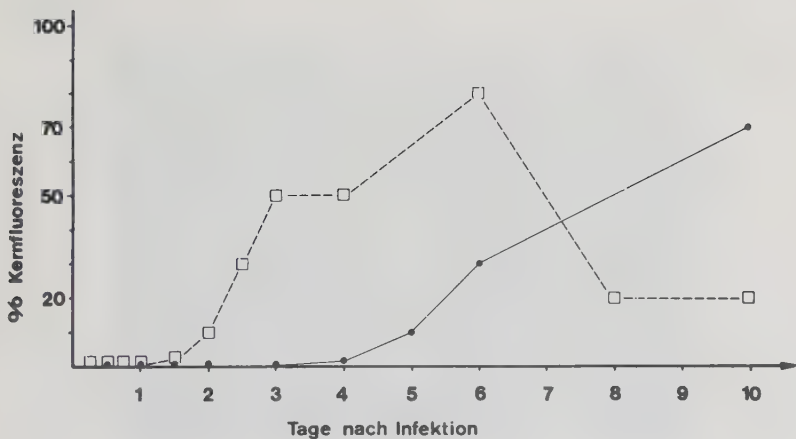


Abb. 10: Kinetik des Auftretens der T-Antigen- und VCA-Fluoreszenz nach BK Virusinfektion von Verozellen. T-Antigen $\square$ --- $\square$, V-Antigen $\bullet$ — $\bullet$.



Abb. 11: T-Antigen-Kernfluoreszenz BK Virus-infizierter Verozellen.

(Tumor)-Antigen bezeichnet wird (BLACK et al., 1963; POPE und ROWE, 1964; RAPP et al., 1964). Dieses wird in der frühen Phase des Infektionszyklus (12-24 Stunden nach der Infektion) unabhängig von der viralen DNS-Synthese gebildet (RAPP et al., 1965). T-Antigene menschlicher Papovaviren und des SV 40 zeigen ausgeprägte Kreuzreaktionen, ohne jedoch völlig identisch zu sein (TAKEMOTO und MULLARKEY, 1973; DOUGHERTY, 1976; BETH et al., 1977; RUNDELL et al., 1977; SIMMONS et al., 1977, 1978).

Um den Zeitpunkt des Auftretens dieses T-Antigens in BK Virus-infizierten Zellen zu bestimmen, wurden Verozellen und Kontrollzellen, wie unter 4.1. beschrieben, infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Nach Reaktion mit einem SV 40-spezifischen T-Antigen Antiserum wurden die Objektträger auf nukleäre Fluoreszenz geprüft (Abb. 11). Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 (□---□) dargestellt. 36 Stunden nach der Infektion waren einzelne, wenige Zellkerne (< 1%) gefärbt, deren Zahl sich nach drei Tagen auf ca. 50% und nach 6 Tagen auf 80% erhöhte. Der Prozentsatz an Zellen mit Kernfluoreszenz betrug 8 bzw. 10 Tage nach Infektion nur noch ca. 20%. Deshalb wurden HEL-Zellen, die mit den einzelnen Virusisolaten infiziert worden waren, nach einer Woche auf die Anwesenheit von T-Antigen geprüft. In allen Fällen wiesen ca. 50% der Zellen T-Ag-Fluoreszenz auf. Nicht infizierte Kontrollzellen zeigten in keinem Fall die typische Kernfärbung.

5. Virusspezifische Antikörper

Die Frage des Auftretens und der Persistenz von BK Virusinfektionen in der Allgemeinbevölkerung und verschiedenen Patientengruppen, sowie Zeitpunkt und Art der Primärinfektion sollte über die im Folgenden beschriebenen seroepidemiologischen Untersuchungen geklärt werden. Dazu wurde der Nachweis BK virusspezifischer Antikörper mittels des HHT, der KBR und der indirekten IgM-Immunfluoreszenz (IgM-IF) benutzt. In verschie-

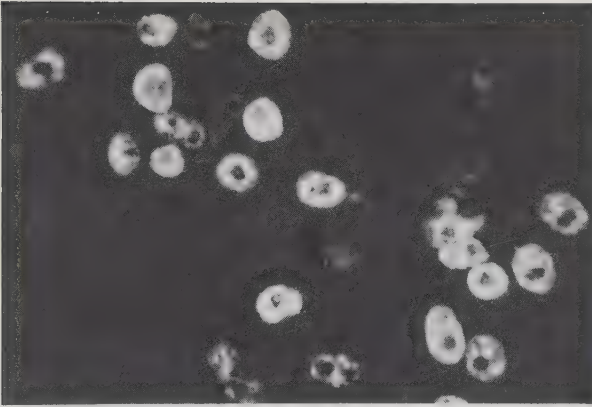


Abb. 12: Darstellung BK virusspezifischer IgM-Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz.

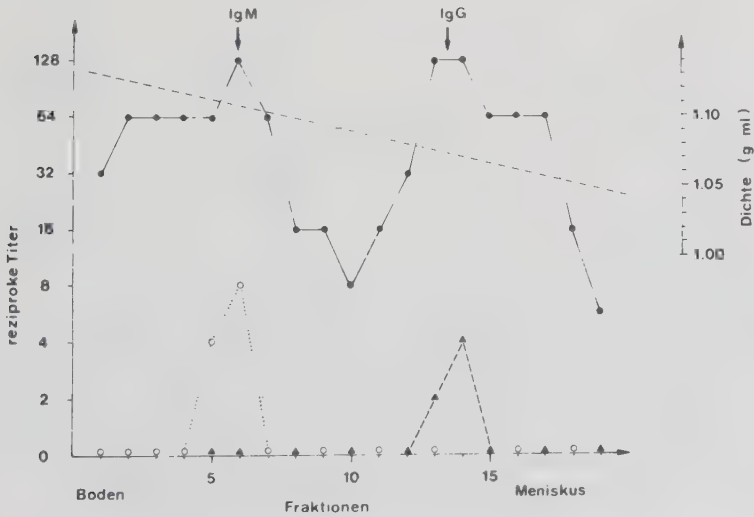


Abb. 13: Serumfraktionierung im Rohruckergradienten.

HHT ●—●, KBR ▲---▲, IgM-IF ○...○

denen Kontrollversuchen wurde die Spezifität des IgM-IF-Tests nachgewiesen. Bei der Färbung uninfizierter Vero- und HEL-Zellen, sowie Cytomegalovirus-infizierter HEL-Zellen, trat nie die typische Kernfärbung auf (Abb. 12). Nach Absorption verschiedener positiver Seren mit BK Virus verschwand die nukleäre Fluoreszenz, während die Absorption mit Rötelnvirus keinen Einfluß hatte. Zwanzig im IgM-IF-Test positiv reagierende Seren wurden im Rohrzuckergradienten fraktioniert. Abbildung 13 zeigt, daß zwei Antikörper-Fraktionen erhalten wurden, die in der Immundiffusion als IgM- und IgG-Antikörper identifiziert wurden. Beide Antikörperklassen waren in der Lage, die Hämagglutination zu hemmen (●—●), während Komplement-bindende Antikörper nur in den IgG-Fraktionen nachweisbar waren (▲---▲). Nach Austesten der einzelnen Fraktionen im IgM-IF-Test blieb die Kernfluoreszenz nur auf die schneller sedimentierenden IgM-Fraktionen beschränkt (o....o). Mit 2-Mercaptoäthanol (2-ME) werden IgM-Moleküle durch Reduktion der Disulfidbrücken in Untereinheiten zerlegt und verlieren ihre biologische Aktivität. Die Folge wäre eine signifikante, mindestens um 4 Titerstufen eintretende Reduktion im HHT (BANATVALA et al., 1967; TAGUCHI et al., 1975), verglichen mit den unbehandelten Seren. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der 2-ME-Behandlung von 35 im IgM-IF-Test positiven Seren. Mit Ausnahme von 3 Seren (Nr. 2550, 3109, NS 895) zeigten alle behandelten Seren signifikante Antikörper-titerreduktionen gegenüber den nicht behandelten Seren.

Dieselben Seren wurden außerdem mit Protein A absorbiert, um IgG-Antikörper zu entfernen. Im HHT zeigten diese dann Titerreduktionen von höchstens drei Titerstufen (Tabelle 2). Zusätzliche Immundiffusionstests der absorbierten Seren schlossen eine IgG-Verunreinigung aus. Im IgM-IF-Test wiesen 16 von 26 Protein A-absorbierten Serumproben (61.5%) die typische Kernfluoreszenz auf. 15 Seren wurden nach Protein A-Behandlung zusätzlich mit 2-ME reduziert und ergaben daraufhin weder im HHT, noch im IgM-IF-Test positive Reaktionen. Schließlich

Serum Nr.	HHT (reziproke Titer)		
	Unbehandelt	Protein A - absorbiert	2-ME - behandelt
2/199	2560	640	40
2/236	2560	640	40
2/290	1280	320	40
2/307	1280	640	80
1787	1280	320	10
2550	640	160	80
8/704	320	160	40
3109	320	40	40
2/139	160	80	10
2/241	160	40	5
2/291	160	40	10
2/170	160	40	10
1781	160	40	5
2/167	80	40	20
2/261	80	40	5
2/215	40	10	5
NS 1193	10240	640	20
NS 1211	5120	640	160
NS 1380	5120	640	160
NS 1159	5120	640	80
NS 880	5120	640	40
NS 817	2560	640	80
NS 1050	2560	640	40
NS 896	2560	320	80
NS 879	2560	640	80
NS 1064	1280	640	40
NS BA 3	1280	640	40
NS 895	640	160	80
NS 1206	640	160	10
NS 416	320	160	0
NS BA 2	320	80	20
NS 1190	320	80	10
NS 224	320	160	20
NS 1372	160	40	0
NS 814	160	80	5

Tabelle 2: Vergleich der HHT - Titer unbehandelter, Protein A-absorbierter und 2-ME behandelter Seren, die in der IgM-IF positiv reagierten.

wurden weitere 72 IgM-IF-positive Seren im Latex-Agglutinationstest auf Anwesenheit von Rheumafaktoren getestet. Hierbei handelt es sich um Autoantikörper v.a. des IgM-Typs, die gegen körpereigene IgG-Moleküle reagieren können (REIMER et al., 1975). Bis auf zwei Seren, die einen Titer von 1:20 hatten, blieben alle übrigen untersuchten Seren in diesem Test negativ.

5.1. Durchseuchung der Allgemeinbevölkerung

656 Seren aus der Serumsammlung unseres Instituts wurden, getrennt nach sieben Altersgruppen, untersucht. Nicht in diesem Serumkollektiv enthalten waren Seren von Tumorkranken und von Kindern mit angeborenen Schädigungen. Als positiv gewertet wurden im HHT ein Antikörpertiter ab 1:40 und in der KBR ab 1:4. Insgesamt konnten in 56.3% (369/656) hämagglutinationshemmende und 36.3% (233/642) Komplement-bindende Antikörper nachgewiesen werden. Antikomplementäre Serumaktivität war der Grund, daß weniger Seren in der KBR ausgewertet werden konnten.

Die altersmäßige Verteilung dieser Antikörper ist in Abbildung 14 dargestellt. Die jüngste Altersgruppe bis zu einem Alter von einem halben Jahr wies 66% (HHT), bzw. 29.5% (KBR) positive Seren auf. Dann fiel der Prozentsatz deutlich ab, um ab einem Alter von 1.5 Jahren bis zu 15 Jahren auf 62% (HHT) bzw. 42% (KBR) wieder anzusteigen. Ein Maximum von 71% (HHT) und 54% (KBR) positiver Fälle wurde in der Altersgruppe 15 bis 30 Jahre erreicht. Darüber hinaus blieb die Anzahl positiver Seren im HHT bei ca. 70% und in der KBR bei ca. 50%. Die untersuchten Seren von Kindern in einem Alter zwischen 1.5 und 5 Jahren ergaben im HHT die höchsten Antikörpertiter (bis zu 1:5120).

Beim Vergleich der in beiden Tests erhaltenden Antikörpertiter aller untersuchten Seren zeigte sich eine gute Übereinstimmung. In Abbildung 15 wurden die geometrischen Mitteltiter hämagglutinationshemmender Antikörper gegen die Titer Komplement-bindender Antikörper aufgetragen. Bis auf einige Ausnahmen entsprachen hohe HHT-Titer auch erhöhten KBR-Titern.

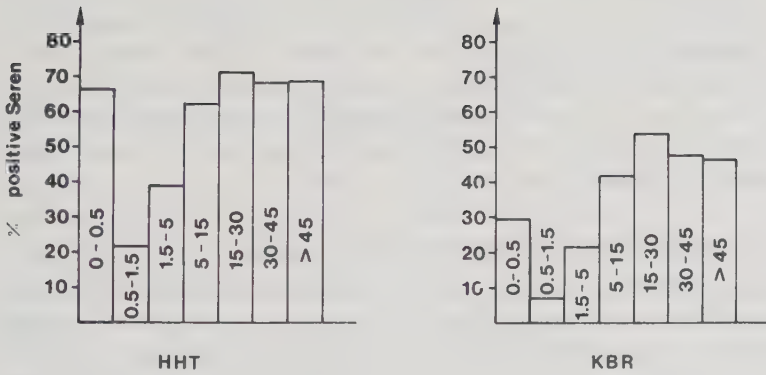


Abb. 14: Altersmäßige Verteilung BK virusspezifischer Antikörper in verschiedenen Altersgruppen.

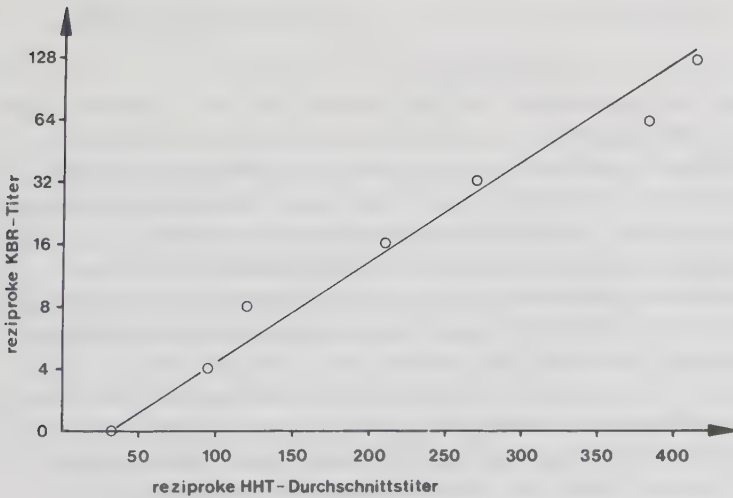


Abb. 15: Korrelation der Antikörpertiter des HHT und der KBR.

Der HHT erwies sich bei den Untersuchungen gegenüber der KBR nicht nur als die empfindlichere, sondern auch als die zuverlässigere Nachweismethode.

BK virusspezifische IgM-Antikörper konnten in drei dieser Serumproben nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um Kinder im Alter zwischen 5 und 15 Jahren. Eines dieser Kinder, ein 7jähriger Junge, hatte auf Grund serologischer Untersuchungen eine frische Epstein Barr-Virus Infektion, während bei den beiden anderen sich keinerlei Hinweise auf eine virale Infektion fanden.

5.2. IgM-Antikörper in Nabelschnurblutseren

Die Untersuchung von 846 Nabelschnurblutseren gesunder Spender im IgM-IF-Test sollte klären, ob eine diaplazentare Übertragung des BK Virus während der Schwangerschaft möglich ist. Tatsächlich konnten in 77 Serumproben (9.1%) BK virusspezifische IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Die erhaltenen Antikörpertiter waren generell nicht hoch. Sie lagen zwischen Verdünnungen von 1:4 bis 1:10, in drei Fällen trat noch nach einer 1:20-Verdünnung die typische Kernfluoreszenz auf.

5.3. Antikörper bei Kindern mit angeborenen Schädigungen

451 Seren von Neugeborenen und Kleinkindern bis zu einem Alter eines halben Jahres, und von Kindern bis zu 1.5 Jahren, die klinische Anzeichen für verschiedene angeborene Schäden aufwiesen, wurden auf das Vorkommen BK virusspezifischer Antikörper untersucht. Auf Grund der klinischen Symptomatik wurden diese in drei Patientengruppen eingeteilt. (1) Mißbildungen, (2) zerebrale und neurologische Schäden und (3) Hyperbilirubinämie, Leber- und Milzvergrößerung. In 368 Serumproben (81.6%) dieser Kinder wurden hämagglutinationshemmende Antikörper mit Titern von 1:40 oder größer nachgewiesen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefaßt und mit Kontrollgruppen entsprechenden Alters verglichen. Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen geometrischen Mitteltiter wurde mit dem verteilungsfreien Mediantest

Patienten- gruppe	Alter (Monate)	H H T		
		Zahl d.Seren/ pos.Seren (%)	Geometr. Mitteltiter (Signifikanz ^a)	IgM-IF pos.Seren (%)
Mißbildungen	0 - 6	157/123 (78.4)	1:60 (ns ^b)	4 (2.5)
	6 - 18	24/12 (50.0)	1:40 (<5%)	-
Zerebrale Störungen	0 - 6	69/58 (84.0)	1:80 (<5%)	2 (2.9)
	6 - 18	11/7 (63.6)	1:45 (<5%)	-
Hyperbiliru- binämie etc.	0 - 6	176/157 (89.2)	1:115 (<0.1%)	11 (6.3)
	6 - 18	14/11 (78.6)	1:115 (<0.1%)	-
Kontrolle	0 - 6	68/45 (66.2)	1:50	-
	6 - 18	96/21 (21.9)	1:15	-

Tabelle 3: Seroaktivität bei Kindern mit verschiedenen angeborenen Schädigungen.

a: statistische Berechnung nach Mediantest

^b_{ns}: nicht signifikant (>5%)

berechnet (OSTLE, 1963; WALTER, 1975). Die Ergebnisse des HHT ergaben für die drei Patientengruppen beider Altersgruppen einen hohen Prozentsatz positiver Seren gegenüber der Seren von Kindern ohne entsprechende Symptome. Mit Ausnahme der Kleinkinder bis zu einem halben Jahr, die verschiedene Mißbildungen des Kopfes, der Extremitäten und/oder der Organe hatten, waren die geometrischen Mitteltiter signifikant erhöht.

IgM-Antikörper gegen BK Virus konnten bei 17 Kindern, jünger als ein halbes Jahr, nachgewiesen werden, keine dagegen in Seren der Kontrollgruppe (Tab. 3). Außerdem war das Serum eines 8,5-Jahre alten Jungen mit Bewegungsstörungen neurologischer Ursache im IgM-IF-Test positiv. Zum Zeitpunkt des IgM-Antikörper Nachweises waren 13 Kinder zwischen 3 und 14 Tagen alt, vier Kinder im Alter von 1 bis 3 Monaten. Fünf dieser Kinder hatten zusätzlich IgG-Antikörper gegen Zytomegalovirus mit erhöhten Titern (1:160-1:1280), die offensichtlich aber durch mütterliche Übertragung zustande kamen. In keinem Fall gab es serologische Anzeichen einer anderen viralen Infektion.

5.4. Antikörper bei Tumorpatienten

163 von 185 Seren (88.1%) verschiedener Tumorpatienten im Alter von 5 bis 15 Jahren hatten im HHT Antikörpertiter von 1:40 oder höher. Der geometrische Mitteltiter war mit 1:160 signifikant erhöht ($< 0.1\%$), verglichen mit dem der Kontrollgruppe (1:40).

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des HHT und der IgM-IF bestimmter Tumorpatienten. Die Durchschnittstitere der Patienten mit verschiedenen Tumorarten waren alle deutlich erhöht. Allerdings standen größtenteils zur Untersuchung bestimmter maligner Erkrankungen nur wenige Serumproben zur Verfügung. BK virus-spezifische IgM-Antikörper ließen sich in 8.6% aller Fälle (16/185) nachweisen, während drei der 99 Kontrollseren (3%) dieser Altersgruppe IgM-Antikörper gegen BK Virus enthielten.

Patienten	H H T		IgM-IF pos.Seren (%)
	Zahl d.Seren/ pos.Seren (%)	Geometr. Mitteltiter	
Akute lymphatische Leukämie	78/60 (76.9)	1:100	8 (10.3)
Morbus Hodgkin	39/36 (92.3)	1:120	3 (7.7)
Lymphosarkom	17/16 (94.1)	1:120	2 (11.7)
Neuroblastom	13/13 (100)	1:200	1 (7.7)
Burkitt's Lymphom (Europ. Typ)	9/ 8 (88.8)	1:120	-
Wilm's Tumor	7/ 7 (100)	1:150	-
Histiozytose	6/ 5 (83.3)	1:120	-
Malignes Lymphom	5/ 5 (100)	1:220	1 (20.0)
Ewing Sarkom	4/ 4 (100)	1:200	1 (25.0)
Osteogenes Sarkom	4/ 4 (100)	1:240	-
Rhabdomyosarkom	3/ 3 (100)	1:160	-
Kontrollgruppe	99/61 (61.6)	1: 40	3 (3.0)

Tabelle 4: Auftreten BK virusspezifischer Antikörper in Seren von Tumorpatienten im Alter von 5 - 15 Jahren.

5.5. Antikörper bei Patienten mit Immungmangelkrankheiten

Von 26 Patienten mit verschiedenen angeborenen Immungmangelkrankheiten wurden 34 Serumproben auf Antikörper gegen BK Virus untersucht.

Es handelte sich dabei um:

- (1) Sieben Knaben im Alter zwischen 3 und 10 Jahren mit Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS), einem rezessiv-geschlechtsgebundenem Defekt der humoralen und zellulären Immunabwehr.
- (2) Dreizehn Patienten im Alter zwischen 8 und 30 Jahren mit Störungen des humoralen Immunsystems, die sich in einem Fehlen oder einem vorübergehenden Mangel an IgG-Antikörpern ausdrücken (Agammaglobulinämie und Hypogammaglobulinämie).
- (3) Drei Patienten im Alter von 3, 7 und 12 Monaten mit schwerem kombiniertem Immungmangel (SCID). Hierbei handelt es sich um Störungen der humoralen und zellulären Immunabwehr.
- (4) Drei Patienten im Alter von 2.5, 4 und 17 Jahren mit chronischer Granulomatose, bei welcher die Granulozyten zwar fähig sind Infektionserreger zu phagozytieren, diese aber nicht zu vernichten.

Insgesamt waren bei 80.8 % (21/26) dieser Patienten hämagglutinierende Antikörper mit Titern $\geq 1:40$ nachweisbar. Der geometrische Durchschnittstiter betrug 1:115. In Tabelle 5 ist die Seroreaktivität dieser 4 Patientengruppen gezeigt. In keinem der untersuchten Fälle waren im IgM-IF Test BK virus-spezifische IgM-Antikörper nachweisbar.

Diagnose ^{a)}	Zahl der Patienten	Positiv (%)	Titer (reziprok)	Geometr. Durchschnittstiter
WAS	7	6 (85)	20 - 640	1:160
IgG-Mangel	13	12 (92)	20 - 2560	1:220
SCID	3	0	20	1:20
chron. Granulomatose	3	3 (100)	40 - 320	1:80
Total	26	21 (80.8)	20 - 2560	1:115

Tabelle 5: Seroreaktivität der untersuchten Patienten mit angeborenen Immundefekten im HHT.

a): Abkürzungen siehe Text

5.6. Untersuchung von Serumpaaren

Zum Nachweis einer frischen BK Virusinfektion wurde, neben dem Nachweis spezifischer IgM-Antikörper, die regelmäßige Titerkontrolle mehrerer Seren bestimmter Patienten durchgeführt. Innerhalb von zwei Jahren standen 317 Seren von 76 Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen zur Verfügung. Diese Patienten, die unter andauernder ärztlicher Kontrolle standen und immunsuppressiv behandelt wurden, waren im Alter zwischen vier und 17 Jahren. Im HHT waren 82.9% positiv und hatten einen geometrischen Mitteltiter von 1:120. Zehn dieser Patienten (13.2%) entwickelten IgM-Antikörper gegen BK Virus. Die Untersuchung der in bestimmten zeitlichen Abständen abgenommenen Seren der einzelnen Patienten zeigte in drei Fällen eine sichere Serokonversion, angezeigt durch Auftreten und Anstieg virusspezifischer Antikörper. Zu Beginn der Untersuchung waren hier weder im HHT, noch in der IgM-IF Antikörper gegen BK Virus nachweisbar. In zwei Fällen wurden 6-9 Monate vor Erscheinen der hämagglutinationshemmenden Antikörper IgM-Antikörper nachgewiesen, die dann während des Auftretens und

Anstiegs der hämagglutinationshemmenden Antikörper (bis zu Titern von 1:160 und 1:640) persistierten. Im dritten Fall wurde die Serokonversion lediglich durch neu im Serum auftretende Antikörper gegen BK Virus im HHT angezeigt, IgM-Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden. Die Grundkrankheit war bei einem 8 Jahre alten Mädchen und einem 15 Jahre alten Jungen akute lymphatische Leukämie, und bei einem 5 Jahre alten Mädchen ein metastasierender Hirntumor (Neuroblastom). Außerdem litten sie zwischenzeitlich an Nierenstörungen und atypischer Lungenentzündung. Zum Zeitpunkt der Serokonversion zeigten sich jedoch klinisch keine besonderen Auffälligkeiten.

Von 58 neugeborenen Kindern, die (1) an Leber- und Milzvergrößerung, (2) an verschiedenen Mißbildungen und (3) an zerebralen Störungen litten, wurden in verschiedenen zeitlichen Abständen Serumproben abgenommen und im HHT und der IgM-IF auf BK virusspezifische Antikörper untersucht. Bei Abnahme der ersten Serumprobe waren alle Kinder zwischen 1 Tag und einem Monat alt. Die Abnahme der zuletzt erhaltenen Seren war mindestens 4 Monate, meist 8 - 15 Monate später. Hierdurch sollte in den einzelnen Fällen, außer einem eventuellen positiven Nachweis BK virusspezifischer IgM Antikörper, durch Auffinden einer Serokonversion, d.h. einer deutlichen Zunahme der IgG Antikörpertiter oder der Persistenz schon in den ersten Serumproben vorhandener IgG Antikörper, eine BK Virus Primärinfektion festgestellt werden. Durch die regelmäßige Titerkontrolle konnte außerdem gezeigt werden, in welchen Fällen IgG Antikörpertiter durch übertragene mütterliche Antikörper verursacht worden waren. Es ist bekannt, daß nach spätestens 5 - 6 Monaten solche diaplazentar übertragene Antikörper des IgG-Typs im Serum des Kindes nicht mehr oder kaum nachweisbar sind.

Bei 39.5 % der untersuchten Neugeborenen (23/58) konnte eine frühe BK Virusinfektion hierbei nachgewiesen werden. Sowohl 37.5 % der Kinder mit Leber- und Milzvergrößerung (15/40), als

auch der Kinder mit Mißbildungen (6/16) zeigten eine frische BK Virusinfektion. Aus der dritten Patientengruppe, den Kindern mit zerebralen Störungen, konnten lediglich zwei Fälle untersucht werden, die beide persistierende IgG Antikörper gegen BK Virus aufwiesen. IgG Antikörper gegen BK Virus mit Titern zwischen 1:80 und 1:640 konnten in 36.2 % aller Erstseren (21/58) nachgewiesen werden, die in der ersten Lebenswoche der Neugeborenen abgenommen worden waren. Serumkontrollen im Verlauf von 5 - 15 Monaten zeigten im HHT unveränderte oder höchstens um zwei Titerstufen niedrigere Antikörpertiter, verglichen zum jeweiligen Erstserum. Nur bei zwei aller untersuchten Kleinkinder konnte ein deutlicher Titeranstieg im HHT von 1:20 auf 1:80 bzw. auf 1:160 nach 3 Monaten festgestellt werden. Gleichzeitig durchgeführte serologische Untersuchungen gaben keinen Hinweis auf eine Cytomegalovirusinfektion der Kleinkinder.

6. Vergleich der verschiedenen Virusisolate

Mit den zwei beschriebenen Methoden wurden 58 Urinproben von 48 Patienten mit verschiedenen angeborenen Immundefekterkrankungen, malignen Erkrankungen und angeborenen Schäden untersucht. Dabei erwiesen sich 12 Patienten (25 %) als BK Virusausscheider. Keine Viruspartikel dagegen konnten im Urin von 15 gesunden Spendern nachgewiesen werden. Eine Aufstellung der untersuchten Patienten ist in Tabelle 6 gemacht. Von 8 Patienten mit primären Immundefekterkrankungen schieden 4 (50 %) BK Virus im Urin aus, von 15 Patienten, die an verschiedenen malignen Erkrankungen litten und alle unter immunsuppressiver Behandlung standen, wurde in 6 Fällen (40 %) Virus im Urin nachgewiesen. Die beiden Virusausscheider der 25 untersuchten Kleinkinder (8 %) mit pränatalen Schädigungen litten zum einen an multiplen, schweren Mißbildungen, zum anderen an neurologischen Schäden und waren erst ein bzw. elf Monate alt. Beide Kinder hatten jedoch keinerlei nachweisbare Störungen des Immunsystems.

Patienten	Alter (Jahre)	Zahl d. Pat./ pos.Patienten	Zahl d. Urine/ positive Urine
WAS	3 - 10	7/3	10/5
X-chromosomal vererbter Hyper- IgM-Mangel	8	1/1	2/1
ALL	2 - 11	6/2	8/2
Morbus Hodgkin	4 - 6	2/1	3/1
Malignes Lymphom	10	2/1	2/1
T-Lymphosarkom	4 - 14	3/1	4/1
Neuroblastom	5	1/1	1/1
Ewing Sarkom	15	1/0	1/0
Angeborene Schäden	0 - 1	25/2	27/2
Kontrollgruppe	7 - 27	15/0	15/0

Tabelle 6: Vorkommen von BK Viruspartikeln in verschiedenen menschlichen Urinen.

WAS: Wiskott Aldrich Syndrom

ALL: Akute lymphatische Leukämie

6.1. Physikalische und biologische Eigenschaften

Daß es sich bei den einzelnen Virusisolaten um Papovaviren handelte, war auf Grund der Morphologie klar erkennbar (Abbildung 16). Im Durchschnitt betrugen die Durchmesser der Virionen 41 bis 44 nm. Nach Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten bandeten die vollen Viruspartikel bei einer Dichte um 1.334 g/ml, die leeren Partikel bei 1.290 g/ml (Abbildung 17). Nach Extraktion der viralen DNS im CsCl-

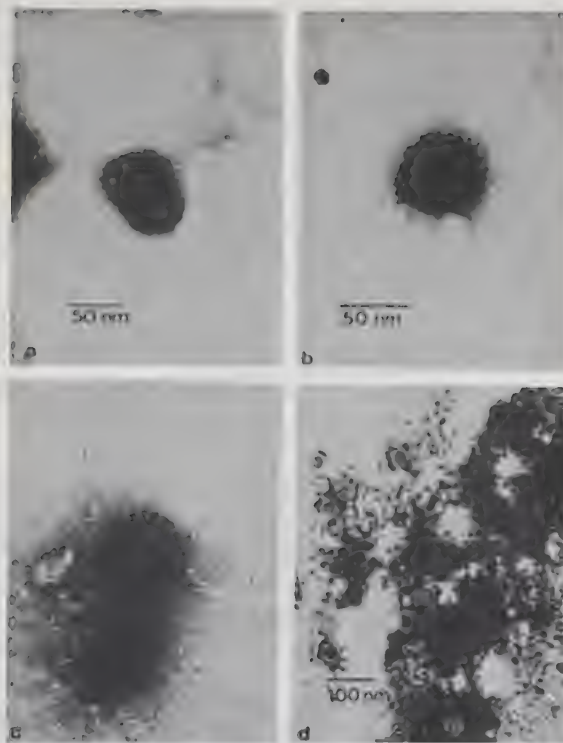


Abb. 16: Papovaviruspartikel in menschlichen Urinen. Elektronenmikroskopische Darstellung nach Negativkontrastierung. (a) Isolat BH, (b) Isolat SJ, (c) Isolat KS, (d) Isolat NA.

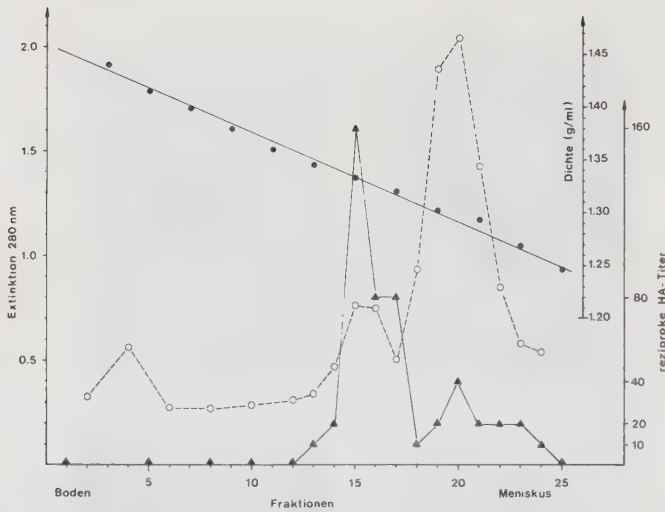


Abb. 17: Bandungsverhalten des BK Virus nach Reinigung im CsCl-Gradienten. Nach Messung der Extinktion bei 280 nm (o---o) und HA-Tests (▲—▲) der einzelnen Fraktionen ergaben sich zwei Gipfel, bei 1.334 g/ml CsCl (volle Capside) und bei 1.290 g/ml CsCl (leere Capside).

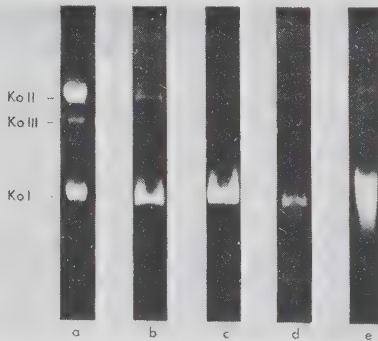


Abb. 18: Elektrophorese ungespaltener Ko I-DNS von BKV (a), SV 40 (e) und verschiedenen Virusisolaten (b-d) im 0.8% Agarosegel.

Äthidiumbromid-Gradienten fand sich Komponente I bei einer Dichte von 1.58 bis 1.59 g/ml, Komponente II und III bei einer Dichte von 1.542 g/ml. Bei der Elektrophorese durch 0.8%ige und 1%ige Agarosegele zeigten die einzelnen DNS-Präparationen in ihrem Wanderungsverhalten keine Unterschiede (Abbildung 18).

Wegen der guten Vermehrung des BK Virus-Prototyps in Verozellen waren erste Versuche, aus den menschlichen Urinen Virus zu isolieren, mit dieser Zelllinie durchgeführt worden. Doch selbst nach einer Kultivierungsdauer von 4 Monaten konnte keine Virusproduktion beobachtet werden. Erst die Inokulation menschlicher Gewebekulturzellen (HEL, HSF, HEK) führte zum Erfolg. Zwischen drei und zehn Wochen nach der Inokulation zeigte sich ein zytopathogener Effekt und die Kulturüberstände hämagglutinierten menschliche O-Erythrozyten. Durch Infektion menschlicher Fibroblasten mit diesen Kulturüberständen konnten die einzelnen Virusisolate weiter angezüchtet werden.

Um erste Aufschlüsse zu erhalten, ob es sich bei den 12 Virusisolaten um BK Virus oder eventuell andere menschliche Papovaviren handelte, wurde die Methode der Immunelektronenmikroskopie angewendet. Da kein Hyperimmunserum gegen BK Virus zur Verfügung stand, wurden zwei Patientenserum, die im HHT einen Titer von 1:1280 hatten, 1:10 in PBS verdünnt und mit CsCl-gereinigten Viruspräparationen (1×10^3 HAU/0.05 ml) zum Zweck einer Antigen-Antikörper-Reaktion zusammengegeben. Nach Prüfung im Elektronenmikroskop zeigten alle 12 Virusisolate im gleichen Ausmaß Agglutinationsreaktionen, wie der BK Virus-Prototyp. Mitgeführte Kontrollreaktionen, bei welchen anstelle des Serums PBS eingesetzt wurde, agglutinierten die Viruspartikel nicht (Abbildung 19). Die Aggregation der Virionen durch spezifische Antikörper läßt sich in Abbildung 19 deutlich erkennen. Die dicht aneinander liegenden Viruspartikel sind an ihrer Oberfläche von einem Saum hell erscheinender Antikörpermoleküle umgeben (Abb. 19c).

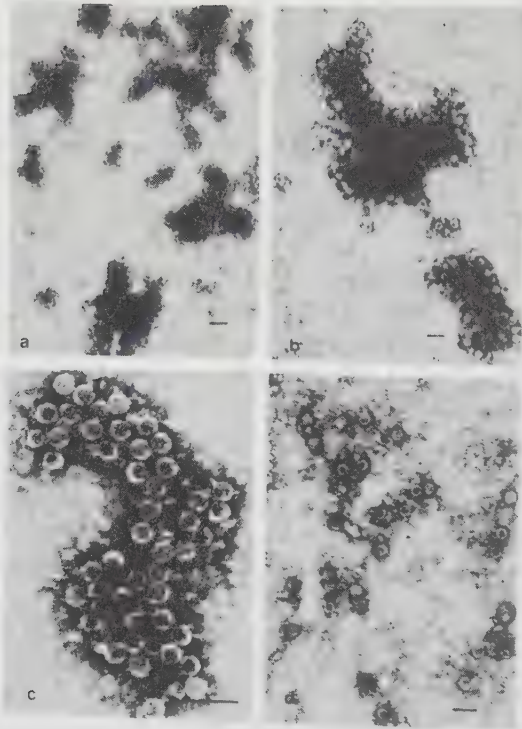


Abb. 19: Elektronenmikroskopische Agglutination des BK Virus (a), der Isolate WA (b) und NA (c), und (d) Kontrollreaktion des BK Virus mit PBS. Die Striche entsprechen 100 nm.

Weiterhin wurden Präparationen der einzelnen Virusisolate dem HHT unterworfen. Durch Verdünnen in DGV wurden sie auf eine Konzentration von 4 HAU/ml eingestellt und im HHT mit einem hoch-titrigen und einem negativen Patientenserum getestet. Tabelle 7 zeigt, daß keine signifikanten Titerunterschiede des Testserums mit den einzelnen, als Antigen eingesetzten Virusisolaten vorlagen. Das negative Patientenserum hemmte in keinem Fall die Hämagglutinationsreaktion. Auch in der Immunfluoreszenzreaktion zum Nachweis viraler Capsid-Antigene zeigten sich durchweg positive Ergebnisse (Tabelle 7).

Virus-isolate a)	BKV	NA	BH	CA	GF	HA	SA	SJ	SE	MH	KS	WA	AH
HHT-Titer (reziproke)	80	40	40	160	40	80	80	40	80	40	80	160	40
VCA-IF	+	+	+	+	+	+	nu ^{b)}	+	nu	nu	+	+	+

Tabelle 7: Vergleich der verschiedenen Virusisolate und BK-Virus-Prototyp (BKV) im HHT und der VCA-IF.

a): Die Bezeichnung der Isolate erfolgte nach den Initialien der Patienten (s. Tab. 8).

b): nu = nicht untersucht.

Um möglicherweise einen schnelleren Hinweis auf das Vorliegen von Papovavirionen im Urin zu erhalten, wurden alle untersuchten Urinproben im HA-Test geprüft. In keinem Fall, auch nicht wo der Virusnachweis im Elektronenmikroskop und der Gewebekultur gelang, trat jedoch eine Hämagglutinationsreaktion ein.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der Tests, die mit den Urin- und gleichzeitig abgenommenen Serumproben der virus-

ausscheidenden Patienten durchgeführt worden waren. Insgesamt wurden 39 Urinproben von 32 Patienten im HHT untersucht. Dabei hemmten 14 (35.9 %) die Hämagglutinationsreaktion bis zu einer maximalen Verdünnung von 1:16. In fünf dieser 14 Urinproben waren keine Viruspartikel nachweisbar.

Patient	Diagnose	Alter (Jahre)	Urin			Serum		
			Virusnachweis		HHT ^d	HHT ^d	IgM-IF ^d	
			EM ^b	HEL ^c				
N.A./m ^{a)}	WAS	4	+	+	(4)	16	40	-
B.H./m	WAS	10	+	+	(4)	-	20	-
C.A./m	WAS	5	+	+	(7)	-	< 10	-
G.F./m	IM ^{e)}	8	+	+	(10)	8	320	-
H.A./w	ALL	11	+	+	(4)	2	160	-
S.A./m	ALL	10	+	+	(7)	4	320	-
S.J./m	MH ^f	4	+	+	(7)	8	80	-
S.E./m	Lymphom	10	+	+	(4)	-	80	-
M.H./m	Lymphosa ^{g)}	14	+	+	(8)	-	80	-
K.S./w	NB ^{h)}	5	+	+	(3)	8	640	10
W.A./m	Mißbild.	1 Mon.	-	+	(4)	4	40	-
A.H./m	NS ⁱ⁾	11 Mon.	+	+	(4)	-	160	-

Tabelle 8: Zusammenfassung der Tests mit klinischem Material BK
Virus ausscheidender Patienten.

a: m = männlich, w = weiblich

^bEM: Elektronenmikroskopie der pelletierten Urinproben.

c: Nach Inokulation in HEL-Zellen; Zahlen in Klammern geben den Zeitpunkt in Wochen nach der Inokulation an, als zytopathogene Veränderungen auftraten.

d: reziproke Titer

^eIM: X-chromosomal vererbter IgM-Immundefizienz.

^fMH: Morbus Hodgkin

^g: Lymphosarkom

^hNB: Neuroblastom

ⁱNS: neurologische, angeborene Schädigungen

Zwei der Seren BK virusausscheidender Patienten hatten Antikörpertiter im HHT, die niedriger als 1:40 waren, und nur in einem Fall waren BK virusspezifische IgM-Antikörper nachweisbar (Tabelle 8).

Schließlich wurden mit den vier Virusisolaten NA, BH, WA und AH Plaque-Tests auf HEL- und Verozellen durchgeführt. Doch nach spätestens vier Wochen starben die Zellen ab, ohne daß eine Plaquebildung eintrat.

6.2. Vergleich der viralen DNS

Die aus den einzelnen Urinproben isolierten Papovaviren und der BK Virus-Prototyp (BKV) wurden durch Spaltung ihrer DNS mit bakteriellen Restriktionsenzymen miteinander verglichen. Solche Endonukleasen erkennen bestimmte Basensequenzen der DNS und schneiden verschiedene Genome in unterschiedliche Bruchstücke bestimmter Größe (NATHANS und SMITH, 1975). Durch Gelelektrophorese dieser Fragmente können verschiedene Desoxyribonukleinsäuren differenziert werden. Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Komponente I - DNS - Präparationen durchgeführt.

6.2.1. Spaltung mit der Restriktionsendonuklease von Escherichia coli (Eco RI)

Nach Spaltung der BKV-DNS mit Eco RI zeigte sich eine Bande an dergleichen Stelle in einem 1%-igen Agarosegel, an der die Komponente III auftrat (Abb. 20). BKV-DNS besitzt eine Spaltstelle für Eco RI, wodurch die kovalent geschlossene, zirkuläre DNS in die lineare Form (Ko III) umgewandelt wird, was schon von anderen Autoren berichtet wurde (OSBORN et al., 1974; HOWLEY et al., 1975a). Nach Spaltung mit Eco RI der DNS von 8 Virusisolaten (NA, BH, CA, HA, SA, SJ, KS, WA) zeigte sich das gleiche Ergebnis.

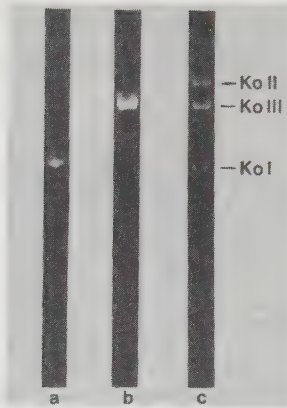


Abb. 20: Eco RI-Spaltung von BKV-KoI-DNS (b). (a) Ungespalte-
ne KoI-DNS, (c) unvollständige Spaltung. Trennung
im 1% Agarosegel.

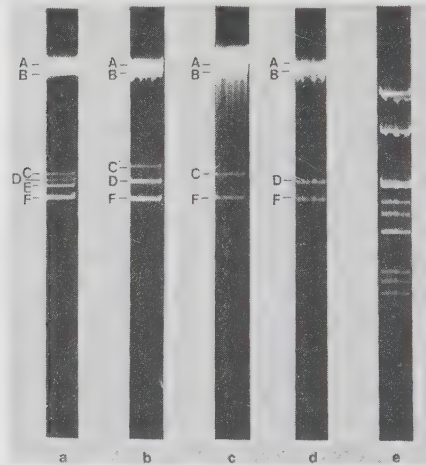


Abb. 21: Hind II/III-Spaltung, Trennung im 4% Polyacrylamid-
gel. (a) BKV-7, (b) SA, (c) KS, (d) WA, (e) SV 40.

6.2.2. Spaltung mit der Restriktionsendonuklease von
Haemophilus influenza d (Hind II/III)

Die Spaltung der DNS von BKV mit einer unfraktionierten Präparation der Restriktionsendonukleasen Hind II/III ergab nach Elektrophorese im 4%-igen Acrylamidgel 6 DNS-Fragmente. Deren Molekulargewichte lagen zwischen 1.4 und 0.29×10^6 d (Tab. 9), berechnet anhand der bekannten Molekulargewichte der R.Hind II-Fragmente von PM-2 DNS (Abb. 4). SV40-DNS dagegen zeigte unter den gleichen Bedingungen das bekannte Spaltmuster von 11 Fragmenten (DANNA und NATHANS, 1971; FIERS et al., 1974). Die nach Hind II/III-Spaltung erhaltenen DNS-Fragmente von 8 verschiedenen Virusisolaten im Vergleich zu BKV und SV 40 sind in Abbildung 21 dargestellt. Die DNS-Bruchstücke wurden nach ihrer Größe alphabetisch mit Großbuchstaben bezeichnet.

Die in ersten Versuchen eingesetzte BKV-DNS, die 6 R.Hind II/III-Fragmente ergab, war aus BKV isoliert worden, das siebenmal in der Gewebekultur passagiert worden war. Da von SV 40 bekannt ist, daß schon nach wenigen Subkultivierungsschritten das Virus heterogene DNS-Populationen erhalten werden (YOSHIIKE, 1968; TAI et al., 1972), wurde BKV-DNS nach der 1. Passage gereinigt und mit Hind II/III gespalten. Nun ließen sich nur die vier Fragmente A, B, C und F in der Gelelektrophorese auftrennen.

Die Spaltung der DNS der verschiedenen Virusisolate, die maximal zweimal subkultiviert worden waren, ergab zum BKV sehr ähnliche, aber nicht in allen Fällen identische Spaltmuster (Abb. 21, Tab. 9). Die DNS der beiden Isolate BH und SA enthielt fünf, die der übrigen Isolate vier R.Hind II/III-Fragmente. Ein zum BKV identisches Spaltmuster wiesen die beiden Isolate SJ und KS auf. Die Fragmente A, B und F zeigten bei BKV und bei allen 8 untersuchten Isolaten ein identisches Wanderungsverhalten im Acrylamidgel. Die DNS der Isolate SA, CA und NA besaßen ein als R Hind II/III-C' bezeichnetes Fragment, das um 0.0265×10^6 d größer war, als das sonst aufgetretene Fragment C.

MW ($\times 10^6$ d)	Virus						
	BKV-7	BKV-1	SA	BH	CA, NA	SJ, KS	WA, HA
1.4	A	A	A	A	A	A	A
1.1	B	B	B	B	B	B	B
0.365	-	-	C'	-	C'	-	-
0.340	C	C	-	C	-	C	-
0.330	D	-	D	-	-	-	D
0.310	E	-	-	E	-	-	-
0.290	F	F	F	F	F	F	F

Tabelle 9: Molekulargewichte und Bezeichnung der DNS-Fragmente nach Hind II/III-Spaltung von BKV nach einmaliger Subkultivierung (BKV-1), siebenmaliger Subkultivierung in Gewebekultur (BKV-7) und den verschiedenen Virusisolaten.

Das Virusisolat NA konnte, wie schon vorher erwähnt, direkt aus der Urinprobe isoliert werden. Das Hind II/III-Spaltmuster dieser DNS ist in Abb. 21b gezeigt. Ein Vergleich zur DNS dieses Virusisolats nach zweimaliger Subkultivierung in der Gewebekultur ergab nach Hind II/III-Spaltung das gleiche Ergebnis.

6.2.3. Spaltung mit der Restriktionsendonuklease von *Haemophilus aegyptius* (Hae III)

Die Restriktionsendonuklease Hae III, die das SV40-Genom 18-mal spaltet (SUBRAMANIAN et al., 1974), wurde zum weiteren Vergleich der DNS von BKV und der einzelnen Virusisolate eingesetzt. Dabei zeigten sich, mit Ausnahme des Virusisolats BH, keine Unterschiede im Spaltmuster der BKV-DNS und der DNS der Isolate CA, NA, HA, KS, SA, SJ und WA. Abbildung 22 zeigt die Auftrennung der DNS-Fragmente im Acrylamidgel nach Hae III-Spaltung von BKV und vom Isolat BH. Anstelle der Doppelbande J, K im BKV-Genom trat bei der BH-DNS nur ein Fragment auf, das

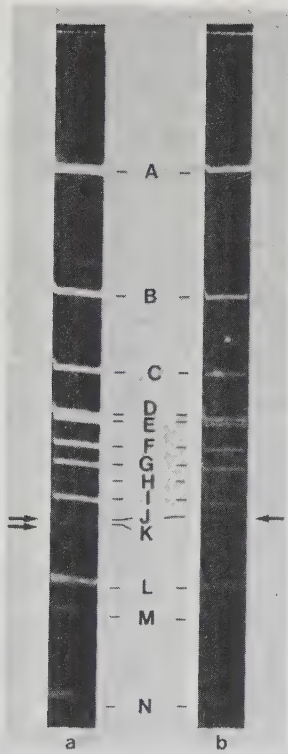


Abb. 22: Trennung der BKV (a) und BH DNS (b) im 4%igen Polyacrylamidgel nach Hae III-Spaltung.

um ca. 0.05×10^5 d größer war. Die Molekulargewichte der 14 Hae III-DNS-Fragmente nach Auftrennung im Acrylamidgel sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Das DNS-Fragment H wies nach Färbung mit Äthidiumbromid eine deutlich schwächere Fluoreszenz auf, als die übrigen DNS-Spaltstücke. Durch Versuche mit verschiedenen Enzymkonzentrationen wurde ausgeschlossen, daß das Fragment H durch unvollständige Spaltung der DNS entstanden war.

Hae III		Alu I	
Bez.	MG ($\times 10^5$ d)	Bez.	MG ($\times 10^5$ d)
A	8.60	A ₁	3.10
B	3.60	A ₂	3.10
C	2.55	B ₂	2.80
D	2.10	C	2.40
E	2.05	D	2.05
F	1.85	E	1.95
G	1.70	F ₁	1.80
H	1.60	F ₂	1.80
I	1.50	G ₂	1.55
J	1.40	H	1.15
K	1.35	I	0.96
L	1.05	J	0.95
M	0.96	K	0.92
N	0.86	L	0.79
		M	0.79
		N	0.70
		O	0.66
		P	0.61
		Q	0.53
		R	0.51
		S	0.42
		T	0.37
		U	0.35

Tabelle 10: Bezeichnung und Molekulargewichte der DNS-Fragmente von BKV nach Hae III und Alu I-Spaltung.

6.2.4. Spaltung mit der Restriktionsendonuklease von Arthrobakter luteus (Alu I)

Zur weiteren Differenzierung der DNS der einzelnen Virusisolate wurden diese mit der Restriktionsendonuklease Alu I gespalten. Dieses Enzym, das im SV40-Genom mehr als 32 Spaltstellen besitzt (ROBERTS et al., 1976; YANG et al., 1976), fragmentierte die BKV-DNS und die DNS von acht getesteten Virusisolaten in mehr als 21 Bruchstücke, die mit ihren Molekulargewichten in Tabelle 10 aufgeführt sind. Die Alu I-DNS-Spaltmuster der einzelnen Isolate im Vergleich zu BKV und SV 40 nach Elektrophorese im 8%igen Acrylamidgel sind in Abbildung 23 gezeigt. Wie man sieht, ergaben sich nur geringfügige Unterschiede zwischen BKV und den Isolaten, im Gegensatz zu SV 40. Am stärksten unterschied sich die DNS des Isolats NA (Abb. 23b). Es fehlten nach Alu I-Spaltung im Vergleich zur BKV-DNS die Fragmente B, G, N und Q. An der Stelle, an der mit allen übrigen untersuchten DNSen das Fragment E als einheitliche Bande auftrat, fand sich nach Spaltung der NA-DNS eine Doppelbande. Nach Spaltung der DNS des Isolats KS fehlten die Fragmente G und Q, und ein zusätzliches Fragment, S' bezeichnet, trat auf (Abb. 23c). Unterschiede zur BKV-DNS im Alu I-Spaltmuster zeigten das Isolat BH, dem lediglich das Fragment G fehlte (Abb. 23d), sowie das Isolat SA, dem das Fragment N fehlte (Abb. 23e).

Zur BKV-DNS völlig identische Alu I-Spaltmuster zeigten schließlich die DNSen der Isolate CA, HA, SJ und WA.

Betrachtet man die Intensität der Fluoreszenz der einzelnen DNS-Bruchstücke nach Färbung mit Äthidiumbromid, so zeigten die Fragmente B, G und N eine wesentlich schwächere Färbung als die übrigen Fragmente. Hieraus läßt sich schließen, daß diese DNS-Bruchstücke in geringerer Molarität vorlagen.

Zur besseren Auftrennung der Fragmente A bis G wurde außerdem eine Elektrophorese im 4%-igen Acrylamidgel durchgeführt

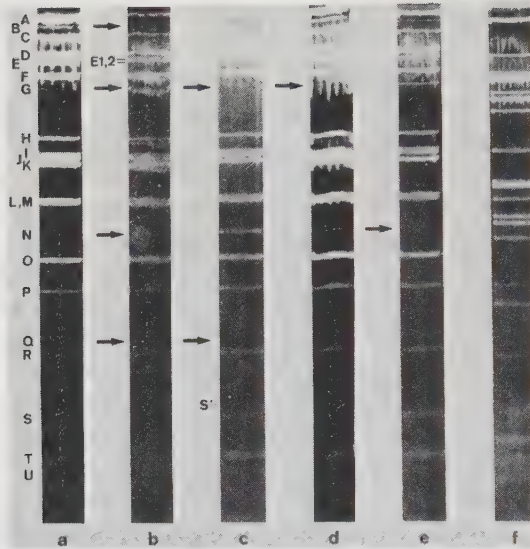


Abb. 23: Trennung der BKV (a), NA (b), KS (c), BH (d), SA (e) und SV 40 DNS (f) im 8%igen Polyacrylamidgel nach Alu I-Spaltung.

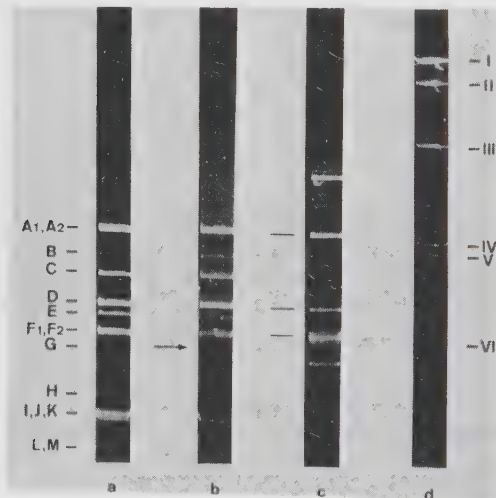


Abb. 24: Trennung der BKV (a), BH (b) und SV 40 DNS (c) im 4%igen Polyacrylamidgel nach Alu I-Spaltung. (d) R.Hind III-Markerfragmente von PM-2 DNS.

(Abb. 24). Einmal wurde das Fehlen des Fragments G deutlicher (Abb. 24b), zum anderen traten hier die Fragmente A und F als Doppelbanden auf. Das bedeutet, daß nach Alu I-Spaltung jeweils zwei DNS-Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von 3.1×10^5 d (Fragment A₁ und A₂) und 1.8×10^5 d (Fragment F₁ und F₂) resultierten.

Die Spaltung der SV40-DNS mit Alu I zeigte ein nur teilweise zur BKV-DNS gleiches Spaltmuster. Es fanden sich DNS-Bruchstücke, die ein zu den Fragmenten E, I, L, P und S identisches Wanderungsverhalten im Acrylamidgel besaßen (Abb. 23f,-).

6.3. Vergleich der Virusproteine

Die bei der DNS-Reinigung des BKV und der Virusisolate erhaltenen Proteinpräparationen wurden in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Dabei traten eine Vielzahl an Polypeptiden mit Molekulargewichten größer als 40.000 d auf, die sich auch in Viruspräparationen nach zweimaliger Reinigung über CsCl-Dichtegradienten fanden. Ebenso zeigte die Aufarbeitung unter stark reduzierenden, bzw. denaturierenden Bedingungen, wie Lösen der Proteine in 66%-iger Essigsäure und Dialyse gegen Puffer mit 8 M Harnstoff, 1% SDS und 0.5% 2-ME, oder 15-minütiges Kochen der Proben, keine Verminderung dieser Polypeptide. Abbildung 25a zeigt das Proteinmuster von CsCl-gereinigtem BKV, im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen nach entsprechender Aufarbeitung. Man sieht, daß neben den viralen Polypeptiden VP 1-5 weitere Proteinbanden mit höheren Molekulargewichten auftraten, die sich nur zum geringeren Teil auch in der Proteinpräparation der Kontrollzellen fanden. Die mit 68 und 45 bezeichneten Proteine hatten die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten, wie Rinder-serumalbumin (BSA, 68.000 d), das dem Kulturmedium zur Anzüchtung des Virus auf der Gewebekultur beigefügt worden war, und wie Ovalbumin (OVA, 45.000 d). Bei dem Protein 68, das in manchen Virusproteinpräparationen in besonders hoher Konzentration vorlag, handelt es sich offensichtlich nicht um eine

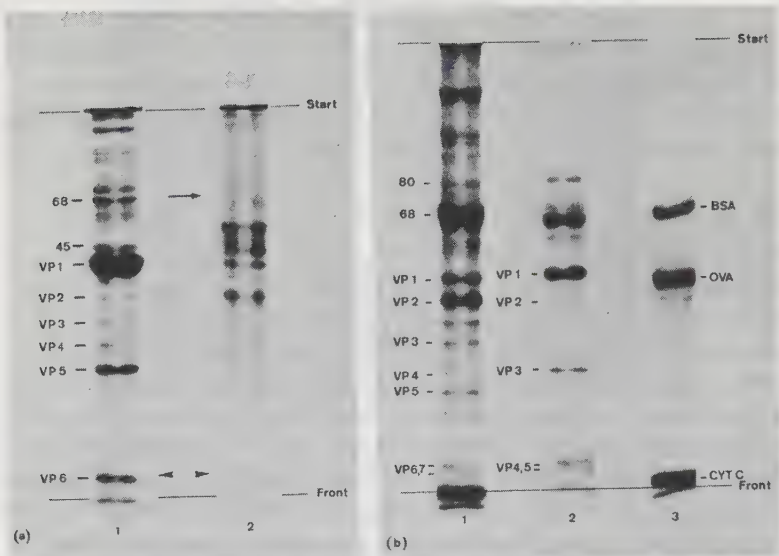


Abb. 25: (a) SDS-Gelelektrophorese von gereinigtem BKV (1) und nicht-infizierten Kontrollzellen (2). Gelkonzentration 12 %. (b) Vergleich von gereinigtem BKV (1) und SV 40 (2) nach Trennung im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. (3) Markerproteine, Abkürzungen siehe Text.

Kontamination des Serumzusatzes des Mediums. In den Kontrollzellen, die genauso aufgearbeitet wurden, wie die virusinfizierten Zellen, fand sich kein Protein dieses Molekulargewichtes. Es kann hierbei natürlich nicht eine Affinität zwischen Serumalbumin und Virus ausgeschlossen werden.

Die Molekulargewichte der viralen Polypeptide wurden nach den bekannten Größen von Rinderserumalbumin (BSA, 68.000 d), Ovalbumin (OVA, 45.000 d), Pepsin (PEP, 35.000 d), Chymotrypsinogen A (CHY A, 25.000 d) und Cytochrom C (CYT C, 12.000 d) berechnet (Abb. 26). Hieraus ergab sich für VP-1 41.000 d, VP-2 34.000 d, VP-3 31.000 d, VP-4 29.000 d und VP-5 26.500 d. Außerdem traten in Proteinpräparationen voller Capside drei Proteine VP-6, 7 und 8 mit Molekulargewichten von 17.000 d, 15.000 d und 12.000 d auf, die den Histonen entsprachen, und zellulären Ursprungs waren (ROBLIN et al., 1971; FREARSON und CRAWFORD, 1972; HUANG et al., 1972).

Beim Vergleich der Proteinmuster der Virusisolate, deren DNS in den vorher beschriebenen Versuchen verglichen worden waren, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In allen Fällen fanden sich die erwähnten Polypeptide VP-1 - 8, die sich auf Grund ihrer Wanderungseigenschaften im SDS-Polyacrylamidgel untereinander und gegenüber BKV nicht unterschieden.

Dagegen zeigten sich im Vergleich zum Proteinmuster von SV 40 (Abb. 25b) ähnliche von anderen Autoren beschriebene Unterschiede (MULLARKEY et al., 1974; BARBANTI-BRODANO et al., 1975; WRIGHT und DI MAYORCA, 1975; WRIGHT et al., 1976). Das virale Hauptprotein VP-1 von BKV und den verschiedenen menschlichen Virusisolaten hatte ein um 5000 d niedrigeres Molekulargewicht, als das von SV 40. Das Protein VP-4 von BKV wies die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie VP-3 von SV 40 auf, ebenso wie die Histone beider Virusstämme, was auch durch Koelektrophorese beider Proteinpräparationen gezeigt werden konnte (nicht abgebildet).

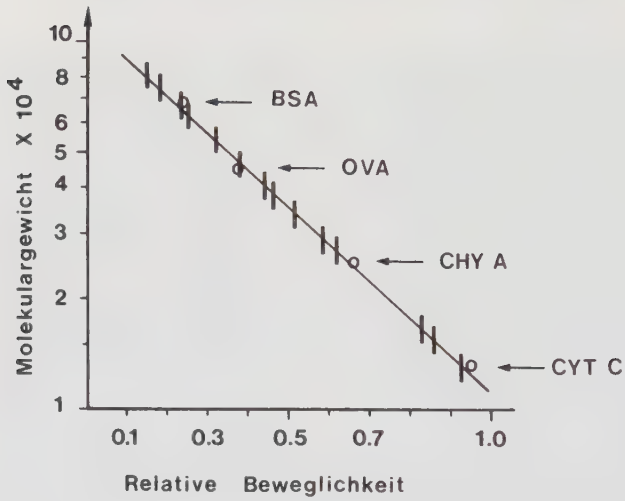


Abb. 26: Berechnung der Molekulargewichte nach der relativen Beweglichkeit der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel (10 %).

7. Versuche zum Virusnachweis in Tumoren

7.1. DNS-DNS Hybridisierung

Verschiedene Biopsien wurden mit der Methode der DNS-DNS Hybridisierung in Lösung auf die Anwesenheit von BK Virus (BKV)-DNS getestet. Untersucht wurde der Einfluß von 0.5 mg - 1 mg Tumor-DNS auf die Reassoziationskinetik von in vitro ^3H -Thymidin-markierter BKV-DNS (spez. Aktivität 3.5×10^6 IpM (μg)). Zur Bestimmung der Eigenreassoziaton wurden im gleichen Testansatz 1 ng, 2 ng und 4 ng markierter Virus-DNS hybridisiert. Als positive Kontrollen wurden außerdem 1 ng BKV-DNS mit 50 ng nicht markierter BKV-DNS und 50 ng nicht markierter SV 40-DNS hybridisiert. Von letzterer DNS ist bekannt, daß sie ca. 20 % Homologie zum BKV-Genom besitzt (HOWLEY et al., 1975a, b; KHOURY et al., 1975; HOWLEY et al., 1976; OSBORN et al., 1976). In allen Fällen wurde die Viskosität der Lösung durch Zugabe von Lachsspermien-DNS auf 1 mg/ml DNS eingestellt.

Getestet wurde Phenol-extrahierte DNS aus den Lymphknoten von 4 Patienten mit Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin), von je einem Patienten mit Lymphozytom, Burkitt's Lymphom, Lymphadenopathie und chronischer myeloischer Leukämie. Außerdem wurde DNS aus einem Retikulumzellsarkom des Gehirns eines Patienten mit Wiskott Aldrich Syndrom (WAS) mehrfach getestet, aus dessen Urin (NA, Tab. 8) BK Viruspartikel isoliert werden konnten. Die Ergebnisse der erhaltenen Reassoziationskinetiken sind in Abbildung 27 dargestellt. Man sieht, daß die Tumor-DNS des WAS-Patienten keine Beschleunigung der Reassoziaton der viralen DNS hervorrief (o---o). Entsprechendes gilt für die übrigen untersuchten Tumor-DNSen. In keinem Fall zeigten die Geraden der Reassoziationskinetik höhere Steigungen, als die der Eigenreassoziaton von BKV-DNS (●—●). Die Hybridisierung in Anwesenheit von SV 40-DNS zeigte dagegen eine deutliche Beschleunigung der Reassoziaton (x—x).

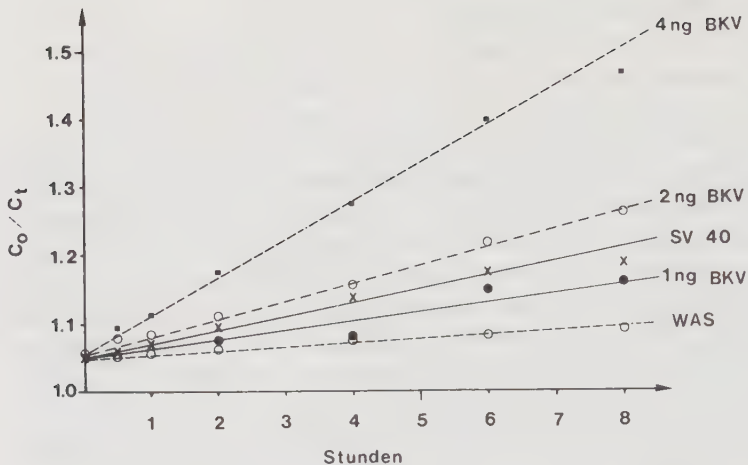


Abb. 27: Reassoziation von ^3H -Thymidin-markierter BKV-DNS (Ko I) in Konzentration von 1 ng ●—●, 2 ng ○---○ und 4 ng ■---■ in Anwesenheit von 1 mg/ml Lachsspermien-DNS, sowie 1 ng BK-DNS mit 1 mg Tumor-DNS ○---○ bzw. 50 ng SV 40-DNS x—x.

7.2. In Ultradünnschnitten

Durch Anfertigung von Ultradünnschnitten verschiedener Tumormaterialien wurde elektronenmikroskopisch versucht, Papovaviruspartikel nachzuweisen. Von tiefgefrorenen, nicht fixierten Biopsien bzw. Autopsien aus dem Nasengang eines Wiskott Aldrich Syndrom Patienten, aus der Leber eines Mädchens mit angeborenem schweren, kombinierten Immundefizienz und aus dem Gehirn sowie der Niere eines Patienten mit progressiver multifokaler Leukoencephalopathie (PML) wurden eine Serie solcher Ultradünnschnitte hergestellt. Nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat war es jedoch in keinem der untersuchten Fälle möglich, im Elektronenmikroskop Viruspartikel darzustellen.

D. DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, Nachweisverfahren für das BK Virus (BKV) zu erarbeiten und es biologisch und biochemisch zu charakterisieren. Neben seroepidemiologischen Untersuchungen zur Verbreitung der BKV-Infektionen wurde versucht, zu klären, ob das Virus bei der Primärinfektion pathogen ist oder ob es zu inapparenten Infektionen kommt, und ob zwischen der Aktivierung des BKV und dem erhöhten Krebsrisiko immunsupprimierter Patienten ein Zusammenhang besteht. Aus menschlichen Untersuchungsmaterialien gewonnene Virusisolate wurden biologisch und biochemisch charakterisiert, und mit dem BKV-Prototyp verglichen.

Der Nachweis des BKV gelingt meist erst nach wochen- oder monatelanger stationärer Kultivierung bestimmter Affenzellen oder menschlicher embryonaler Zellen (LECATSAS et al., 1974; SEEHAFFER et al., 1975). Daher versuchte ich zuerst, optimale Kultivierungsbedingungen mit dem BKV-Prototyp zu finden, der ursprünglich auf Verozellen angezüchtet worden war (GARDNER et al., 1971). Als Nachweis einer Virusvermehrung dienten typische zytopathogene Veränderungen der infizierten Gewebekultur, wie granuliertes Erscheinen des Zellrasens, Anschwellen vereinzelter Zellen mit einhergehender Zellkernvergrößerung und Vakuolisierung (LECATSAS et al., 1974; JUNG et al., 1975; MARALDI et al., 1975). Nach Beginn dieser virusbedingten Zellveränderungen ließen sich im Hämagglutinationstest (HA) mit menschlichen O-Erythrozyten in den Kulturüberstand entlassene, neu gebildete Viruspartikel frühestens 2 Wochen nach der Infektion nachweisen (Tab. 1). Nach Entfernung unspezifischer Hemmer der Hämagglutination im Kulturmedium durch Fluorocarbon-Extraktion (MÄNTYJÄRVI et al., 1972; 1973), stellte dieser Test einen schnellen und einfachen Virusnachweis dar. Nach Virusreinigung im CsCl-Gradienten zeigten sowohl die Fraktionen der vollen, DNS enthaltenden Capside, als auch die der leeren Capside HA-Aktivität (Abb. 17) auf Grund der Assoziation des

Hämagglutinins mit der Virusoberfläche (TAKEMOTO und MULLARKEY, 1973; SEEHAFFER et al., 1974).

Versuche zur Abhängigkeit der BKV-Vermehrung in permissiven Zellen von der Inkubationstemperatur zeigten eindeutig ein Temperaturoptimum von 37°C . Bei Kultivierung der infizierten Zellen mit niedrigeren Temperaturen von 34°C und 30°C traten zytopathogene Veränderungen und HA-Aktivität erst nach wesentlich längeren Inkubationszeiten auf (Abb. 6), während bei Temperaturen unter 30°C nach 5 Wochen keinerlei Anzeichen einer Virusvermehrung beobachtet werden konnten. Versuche mit verschiedenen Eingangsvirusmultiplizitäten, gemessen an den HA-Titern der Infektionslösungen, zeigten, daß erwartungsgemäß mit zunehmender Viruseingabe auch eine gesteigerte Virusproduktion auftrat. Mit Virusmultiplizitäten größer als 2.5×10^3 HAU/ml, was ungefähr 7.5×10^9 Viruspartikeln entsprach (MÄNTYJÄRVI et al., 1972), ließ sich jedoch keine Steigerung der Virusausbeute erzielen. Schwankungen im zeitlichen Auftreten der zytopathogenen Veränderungen und der Virusausbeute, gemessen im HA-Test, bei der Kultivierung mit gleicher Virusmultiplizität infizierter Zellen wurden oft festgestellt, waren aber bei Viruseingaben mit mehr als 2.5×10^3 HAU/ml auffallend ausgeprägter. Diese von Experiment zu Experiment oft unterschiedlichen Ergebnisse sind auch von anderen Autoren berichtet worden (TAKEMOTO und MULLARKEY, 1973; SEEHAFFER et al., 1974). Offensichtlich wird vor allem bei der Subkultivierung unverdünnter Viruspassagen mit hoher Multiplizität ein beträchtlicher Anteil defekter, nicht infektiöser Virionen produziert (HOWLEY et al., 1975a). Außerdem bleibt ein Teil der produzierten Virionen zellassoziiert, auch wenn Hämagglutinin im Kulturüberstand nachweisbar ist (MÄNTYJÄRVI et al., 1972; SEEHAFFER et al., 1975). Die Subkultivierungsversuche zeigten, daß häufiges Umsetzen der infizierten Gewebekultur nach Erreichen eines zusammenhängenden Zellrasens die Virusvermehrung deutlich förderte. Dies drückte sich nicht nur in höheren HA-Titern aus (Abb. 7). Nach Färbung im Immunfluoreszenztest enthielten mehr als 70 % der Zellen virales Capsidantigen (VCA)

im Zellkern, dem Ort der Virusproduktion (LECATSAS et al., 1974; MARALDI et al., 1975). Nur 5-10% VCA-Bildung dagegen fanden TAKEMOTO und MULLARKEY (1973). Möglicherweise konnte die Virusproduktion eben dadurch gesteigert werden, daß sich die Zellen der Gewebekultur während der Virusvermehrung permanent in der Wachstumsphase befanden. Es ist bekannt, daß zu einer Virusvermehrung biosynthetische Ereignisse der Wirtszellen notwendig sind, die in der späten G1-Phase oder der S-Phase des Zellzyklus ablaufen (PAGES et al., 1973; THORNE, 1973). Nicht auszuschließen ist jedoch auch eine gewisse Adaption des BKV an die Verozellen, da z.B. die aus menschlichen Urinen gewonnenen Virusisolate sich in diesen Affenzellen kaum produktiv anzüchten ließen.

Zur quantitativen Bestimmung infektiöser BK Viruspartikel wurden Plaquetitrationen in Verozellen und menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten (HEL) durchgeführt. Unter den Kultivierungsbedingungen im halbfesten Agarmedium konnten die Zellkulturen maximal 5 Wochen gehalten werden. In diesem Zeitraum konnte weder mit dem BKV-Prototyp, noch mit 4 menschlichen Virusisolaten eine Plaquebildung festgestellt werden. Offensichtlich kommt es unter diesen stationären Kultivierungsbedingungen zu einer extrem schlechten Vermehrung und Freisetzung der Virionen. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich von SEEHAFFER et al. (1978) berichtet. Lediglich in menschlichen embryonalen Nierenzellen war bisher in einigen Fällen eine Plaquetitration und Plaquereinigung von BK Viren gelungen (MAJOR und DI MAYORCA, 1973; DOUGHERTY und DI STEFANO, 1974).

Um möglicherweise einen schnelleren Nachweis und ein Titrationssystem für BK Viren zu erhalten, wurde die Frage untersucht, ob BKV eine ähnliche Helferfunktion wie das Simian Virus 40 (SV 40) für die Vermehrung von Adenoviren in semipermissiven Affenzellkulturen besitzt. Hierzu wurden Koinfektionsversuche in Verozellen mit Adenovirus Typ 12 und Typ 2 und BKV sowohl

in Roux-Schalen, als auch Plaquetests im halbfesten Agarmedium durchgeführt. Nach gleichzeitiger Infektion der Gewebekultur mit BKV und Adenovirus wurde jedoch keine Induktion oder Steigerung der Adenovirusvermehrung beobachtet. Da vermutet wird, daß die Helferfunktion des SV 40 für eine Adenovirusreplikation mit einer Stimulierung der Wirtszell-DNS-Synthese durch die SV 40 Infektion gekoppelt ist (JERKOFISKY und RAPP, 1973), wurden Verozellen 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der BKV Infektion mit Adenovirus Typ 2 koinfiziert. Hierdurch sollte geklärt werden, ob erst durch die zeitliche vorgeschobene BKV-Infektion produzierte frühe Virusproteine oder die erfolgte Stimulierung der Wirtszellen eine Adenovirusreplikation ermöglicht wurde. Die fehlende Induktion oder Steigerung der Adenovirusvermehrung bei diesen Versuchen macht eine dem SV 40 entsprechende Helferfunktion des BKV unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der Versuche der BK Virusvermehrung in verschiedenen Gewebekulturzellen zeigten in Übereinstimmung zu anderen Arbeitsgruppen, daß die Anzüchtung des Virus in Affenzellen nur beschränkt gelingt (TAKEMOTO und MULLARKEY, 1973). Von den vier untersuchten Affenzelllinien erwiesen sich lediglich Verozellen als permissiv (Tab. 1), dagegen vermehrte sich BKV in allen menschlichen embryonalen Zellkulturen produktiv (TAKEMOTO und MULLARKEY, 1973; SEEHAFFER et al., 1975). Die Infektion menschlicher Leukozyten aus dem Blut gesunder Spender mit BKV schließlich sollte zeigen, ob eine Virusvermehrung, eine virusbedingte Stimulierung oder Transformation dieser Zellen möglich ist. Auf Grund der Isolierung von Papovaviruspartikeln aus Lymphozytenkulturen zweier Masernpatienten wurde vermutet, daß BKV latent in solchen Zellen vorlag, und durch eine vorübergehende Störung der Immunitätslage reaktiviert und produziert wurde (LECATSAS et al., 1976c, 1977b). Die durchgeführten Infektionsversuche mit gereinigtem BKV gaben jedoch bezüglich morphologischer Veränderungen und Lebensdauer der Leukozytenkulturen im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollkulturen keine

Unterschiede. Dies und die fehlende HA-Aktivität der Kulturüberstände ergaben keinen Hinweis eines direkten Viruseffekts auf diese Zellen, sowie einer produktiven Virusvermehrung in den Leukozyten.

Papovavirus-infizierte, permissive Zellen zeigen als Folge der viralen DNS-Replikation und des Viruszusammenbaus ein neues intranukleäres Antigen, das als Virionantigen (V) oder virales Capsidantigen (VCA) bezeichnet wird. Es läßt sich im späteren Infektionszyklus in der Immunfluoreszenz mit virusspezifischen Antikörpern darstellen (SALZMANN und KHOURY, 1974). Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der VCA-Bildung in BKV-infizierten Verozellen wurde, mangels eines Hyperimmunserums, ein Patientenserum mit hohem IgG-Antikörpertiter gegen BKV eingesetzt. In Immunfluoreszenztests auf T-Antigen mit diesem Patientenserum in SV 40-infizierten Ritazellen und Verozellen 2 Tage nach BKV-Infektion konnte das Vorhandensein möglicher Antikörper gegen T-Antigen in diesem Serum ausgeschlossen werden. Frühestens 4 Tage nach der Infektion trat in wenigen Zellen (1 %) VCA-Bildung auf, die im Verlauf langsam zunahm, und 10 Tage nach der Infektion ein Maximum (70 %) erreichte. Zu späteren Zeitpunkten des Infektionszyklus bei maximaler Virusproduktion, gemessen an virusbedingten Zellveränderungen und HA-Titern, konnte keine eindeutige VCA-Fluoreszenz mehr dargestellt werden. Die Zellen waren dann stark degeneriert, und die Zellkerne auf Grund des Ausschleusens der fertigen Virionen größtenteils zerfallen (MARALDI et al., 1975). Ein Vergleich der HA-Aktivität, der VCA-Bildung und virusbedingter Zellveränderungen zu verschiedenen Zeiten nach der BKV-Infektion (Tab. 11) zeigte, daß zwischen 2 und 4 Tagen nach der Infektion die Virusproduktion im Zellkern begann. Ab dem 10. Tag wurden offensichtlich neugebildete Virionen aus den Zellen entlassen, was sich in zunehmenden HA-Titern der Kulturüberstände ausdrückte, bis nach 3 bis 4 Wochen der Zellrasen total degeneriert war.

Tage nach Infektion	HA-Titer (reziprok)	VCA-IF (pos. Zellen)	CPE
2	16	-	-
4	-	1 %	-
5	-	10 %	-
6	-	30 %	+
10	8	70 %	++
15	64	70 %	+++
21	512	n.b. a)	+++
30	2048	n.b.	++++

Tabelle 11: Vergleich der HA-Titer, der VCA-Bildung und zytopathogener Veränderungen (CPE) BKV-infizierter Verozellen nach verschiedenen Zeiten. Die Angaben sind Durchschnittswerte aus 6 Experimenten.

a) n.b.: nicht bestimmbar

Ein weiteres virusspezifisches, aber nicht mit der Virushülle assoziiertes Antigen, das Tumor (T)-Antigen, läßt sich sowohl in Papovavirus-infizierten, permissiven Zellen, als auch in transformierten Zelllinien in der Immunfluoreszenz nachweisen. Dieses frühe, intranukleäre Antigen BKV-infizierter Gewebekulturen zeigt eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit dem SV 40 T-Antigen (TAKEMOTO et al., 1973; SHAH et al., 1973; TAKEMOTO und MARTIN, 1976). Unterschiede der T-Antigene verschiedener Polyomaviren fanden sich lediglich in strukturellen, sub-spezifischen Determinanten (DOUGHERTY, 1976a; BETH et al., 1977; RUNDELL et al., 1977). So war es möglich mit einem für SV 40 T-Antigen spezifischem Antiserum die Kinetik des BKV T-Antigens in Verozellen zu bestimmen. Schon 36 Stunden nach der Infektion zeigten einzelne Zellen (< 1 %) die typische Kernfluoreszenz. Der Prozentsatz der T-Antigen enthaltenden Zellen stieg dann rasch an, um 6 Tage nach der Infektion mit

80% ein Maximum zu erreichen. Ähnliche Ergebnisse waren auch von TAKEMOTO und MULLARKEY (1973) berichtet worden. Das bedeutete, daß schon nach wenigen Tagen durch das Auftreten des T-Antigens in der Gewebekultur ein Hinweis auf eine Papovavirusinfektion gegeben war.

Seroepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung der BKV-Infektion in der Allgemeinbevölkerung Süddeutschlands ergaben übereinstimmende Ergebnisse zu Studien in anderen Ländern (RZIHA et al., 1978a). Zum Beweis einer gegenwärtigen oder durchgemachten BKV-Infektion wurden die Seren von Spendern verschiedener Altersgruppen im Hämagglutinationshemmtest (HHT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR) getestet. Dabei zeigte sich, daß nach einem Alter von 18 Monaten ein deutlicher Anstieg im Auftreten BKV-spezifischer Antikörper stattfand, und mit 71% (HHT), bzw. 56% (KBR) in der Altersgruppe von 15-30 Jahren ein Maximum positiver Seren erreicht wurde. Dieses erniedrigte sich in den höheren Altersgruppen nur geringfügig (Abb. 14). Hieraus ließ sich schließen, daß der Zeitpunkt der Primärinfektion in der frühen Kindheit lag, zumal auch die höchsten Antikörpertiter in der Altersgruppe von 1.5 - 5 Jahren gefunden wurden. Das erhöhte Auftreten der Antikörper gegen BKV bei bis zu 6 Monate alten Kleinkindern dürfte auf mütterliche Übertragungstiter zurückzuführen sein. Das Vorkommen des hohen Prozentsatzes an hämagglutinationshemmenden und komplementbindenden Antikörpern, die beide bis ins hohe Lebensalter persistierten, zeigte die bekannt hohe BKV-Durchseuchungsrate der Bevölkerung.

Beim Vergleich der Ergebnisse der beiden serologischen Tests zeigte sich eine gute Korrelation (Abb. 15), was von anderen Autoren ebenfalls berichtet wurde (GARDNER, 1973; JUNG et al., 1975). Seren mit erhöhten HHT-Titern wiesen in fast allen Fällen auch in der KBR erhöhte Titer auf und umgekehrt. Da sich außerdem der HHT als wesentlich empfindlicher und zuverlässiger

gegenüber der KBR erwies, wurde bei den folgenden Untersuchungen der Seroreaktivität bestimmter Patientengruppen nur noch der HHT eingesetzt.

Die Art der Übertragung des BKV und ein Zusammenhang irgendwelcher klinischer Symptome mit der Virusinfektion sind bisher unbekannt. Aufklärung hierzu sollte der Nachweis des Zeitpunktes einer Primärinfektion anhand BKV-spezifischer IgM-Antikörper bringen. Es ist bekannt, daß spezifische IgM-Antikörper innerhalb weniger Tage nach einer Virusinfektion im Serum auftreten und meist nach 8-12 Wochen nicht mehr nachweisbar sind (BEST et al., 1969; BANATVALA et al., 1970; HUMPHREY und WHITE, 1971). Mittels der indirekten Immunfluoreszenz wurde ein einfacher, schneller und zuverlässiger Test auf BKV-spezifische IgM-Antikörper entwickelt (RZIHA et al., 1978a). Die geringe Abnahme der Antikörpertiter im HHT nach Absorption der Immunglobuline G mit Protein A, sowie die mindestens vierfache Titerreduktion nach 2-ME-Behandlung (Tab.2) bewies letztlich das Vorkommen virusspezifischer IgM-Antikörper. Seren mit positiver Reaktion im IgM-Immunfluoreszenztest (IgM-IF) wiesen somit auf eine frische BKV-Infektion hin. Entsprechende Ergebnisse wurden auch für Rötelnvirusinfektionen beschrieben (ANKERST et al., 1974; FORGHANI et al., 1973). Nach Protein A-Absorption gelang nicht mehr in allen Fällen eine positive Reaktion im IgM-IF-Test. Die gleiche Beobachtung machten ROGGENDORF et al. (1976) und fanden, daß durch Protein A-Absorption neben IgG-Antikörpern auch ein geringer Anteil der IgM-Antikörper aus dem Serum entfernt wird. Das Ausbleiben der Färbereaktion in der IgM-IF bei einzelnen Seren mit vorher niedrigen IgM-IF-Titern ließ sich daher durch relativ geringe IgM-Konzentrationen erklären. Auch die fehlende Reaktivität der IgM-Globuline in der KBR nach Serumfraktionierung im Rohrzuckergradienten könnte hiermit erklärt werden. Zumal dieser Test wesentlich unempfindlicher als der HHT war, aber prinzipiell virusspezifische IgM-Antikörper in der KBR nachweisbar sind (SCHMITZ, pers.Mitteilung). Schließlich konnte

durch Latexagglutinationsteste ein möglicher Einfluß von Rheumafaktoren auf die Anzahl positiver Seren im IgM-IF-Test ausgeschlossen werden (REIMER et al., 1975). Da Antikörper des IgM-Typs auf Grund ihrer Molekülgröße im Gegensatz zu IgG-Antikörpern nicht von der Mutter durch die Plazenta auf den Fötus übertragen werden können, deutet der Nachweis virusspezifischer IgM-Antikörper im Nabelschnurblutserum auf eine in utero Infektion des Fötus hin (HUMPHREY und WHITE, 1971). Der überraschend hohe Prozentsatz an BKV-spezifischen IgM-Antikörpern in 9.1% (77/846) der untersuchten Nabelschnurblutseren zeigte, daß konnatale BKV-Infektionen relativ häufig zu sein scheinen. Die Vermutung einer möglichen diaplazentaren Virusübertragung während der Schwangerschaft (TAGUCHI et al., 1975) konnte durch diese Ergebnisse erhärtet werden. Möglicherweise findet während der Schwangerschaft eine Aktivierung oder Reaktivierung des BKV und eine Übertragung auf den Fötus statt.

Seren von Neugeborenen und Kleinkindern bis zu einem Alter von 18 Monaten mit Mißbildungen (181 Seren), zerebralen Schäden (80 Seren) und anormalen Leber- und Milzvergrößerungen (190 Seren), sowie 164 Kontrollseren wurden daher auf Antikörper gegen BKV untersucht (Tab. 3). Bei insgesamt 17 dieser Kinder wurden BKV-spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen, keine dagegen in den altersentsprechenden Kontrollseren. Die Tatsache, daß 13 Neugeborene mit den erwähnten angeborenen Schädigungen zum Zeitpunkt des IgM-Antikörperrnachweises erst zwischen 3 und 14 Tagen alt waren, konnte als weiterer Hinweis einer pränatalen BKV-Infektion gedeutet werden. Beim Vergleich der im HHT erhaltenen Antikörpertiter zeigten sich für die drei Patientengruppen höhere Durchschnittstitere gegenüber der Kontrollgruppe. Ein statistisch hoch signifikanter Titerunterschied und eine Häufung BKV-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper wurde bei Kindern mit Leber- und Milzvergrößerungen und Frühmangelgeburten beobachtet. Dieser Befund war deshalb von großem Interesse, da hier ein erster Hinweis vorliegen könnte, welche Krankheitserscheinungen mit einer BKV-Primärinfektion einher-

gehen könnten. Die regelmäßige Titerkontrolle der Seren von 58 Neugeborenen mit den genannten Schäden über einen Zeitraum von 5 - 15 Monaten zeigte in 39.5 % eine Persistenz virusspezifischer IgG-Antikörper. Passiv während der Schwangerschaft übertragene, mütterliche Antikörper des IgG-Typs zeigen beim Neugeborenen mit zunehmendem Alter einen exponentiellen Titerabfall, und sind, je nach Höhe der Ausgangstiters, meist nach 6 Monaten nicht mehr nachweisbar (HUMPHREY und WHITE, 1971). Im Falle einer durchgemachten Virusinfektion dagegen persistieren sie über Jahre, wobei Titerabfälle um höchstens 2 - 3 Stufen beobachtet werden (MÄNTYJÄRVI et al., 1973; SHAH et al., 1974; STAGNO et al., 1975). Das bedeutet, daß bei fast 40 % der untersuchten Kleinkinder eine frische BKV-Infektion angenommen werden konnte. Lediglich in zwei Fällen ergab die virologische Untersuchung das Vorliegen einer Doppelinfektion mit BKV und Cytomegalovirus. Die serologischen Tests der Serumpaare bestätigten somit die mit Einzelseren erhaltenen Ergebnisse. Auf Grund der Befunde, die auf häufig auftretende intrauterine Infektionen mit BKV und eine signifikante Häufung positiver Seren hinwiesen, sowie das vermehrte Auftreten von Primärinfektionen bei Neugeborenen und Kleinkindern mit anormalen Leber- und Milzvergrößerungen und Frühmangelgeburten, erhoben die Frage eines möglichen Zusammenhangs einer BKV-Infektion und Feto-, bzw. Embryopathien. Dazu kam die Isolierung von Papovaviren des BK-Typs aus den Urinproben zweier solcher Kleinkinder im Alter von nur 11 und 28 Tagen. Neben dem Bericht von HASHIDA et al. (1976) gelang erstmals der sichere Virusnachweis bei Kindern ohne jegliche Anzeichen einer Immunstörung und einer anderen Virusinfektion. Bei einigen Virusarten, wie z.B. Cytomegalovirus, Herpes simplex Virus, Röteln- und Mumpsvirus, ist bekannt, daß eine bei der Mutter subklinisch verlaufende, intrauterine Infektion oft nachhaltige schwere Störungen der fetalen Entwicklung hervorrufen kann. Weitere gezielte Untersuchungen sollten in Zukunft Aufschluß geben, ob tatsächlich zwischen einer BKV-Infektion und solchen Fröhschäden ein kausaler Zusammenhang besteht.

Auf Grund des in der Einleitung erwähnten onkogenen Potentials menschlicher Papovaviren sollte die Frage einer Beziehung von BKV-Infektion zu bestimmten Tumorarten, Tumorzinzidenz und Auftreten virusspezifischer Antikörper bei Tumorpatienten untersucht werden. Von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen im Alter zwischen 4 und 17 Jahren (Tab. 6), die alle immunsuppressiv behandelt worden waren, erwiesen sich 40 % als Virusausscheider. Aus den Urinproben dieser Patienten konnte BKV außer durch Anzüchtung in Kulturzellen, auch in elektronenmikroskopischen Präparationen der sedimentierten Urine gezeigt werden. Biologische und biochemische Untersuchungen der Virusisolate, die im Folgenden noch diskutiert werden, bestätigten den BK-Typ. Versuche zur Seroreaktivität solcher Patienten zeigten insgesamt eine höhere Rate im HHT positiv reagierender Seren (88.8 %) und signifikant höhere Durchschnittstitern (1:160), verglichen mit der altersentsprechenden Kontrollgruppe (Tab. 4). Entsprechend fanden sich auch BKV-spezifische IgM-Antikörper in 8.6 % der untersuchten Seren, gegenüber nur 3 % der Seren gesunder Spender. Die Betrachtung der Ergebnisse der Virusisolierungsversuche und der Seroreaktivität getrennt nach einzelnen Tumorarten (Tab. 4 und 6), wiesen nicht darauf hin, daß bestimmte maligne Erkrankungen bevorzugt mit einer BKV-Infektion einhergingen. So mußten die Befunde eher als eine Bestätigung der Vermutung anderer Autoren angesehen werden, daß die Immunsuppression an sich, sei es auf Grund medikamentöser Behandlung oder angeborener Defekte, ein bestimmender Faktor der Papovavirusaktivierung darstellt (TAKEMOTO et al., 1974; ZU RHEIN und VARAKIS, 1974; REESE et al., 1975; GARDNER, 1977). Dafür sprach auch die hohe Zahl an Virusausscheidern (50 %) und eine den Tumorpatienten ähnliche Erhöhung des humoralen Antikörperspiegels bei Patienten mit angeborenen Immunmangelkrankheiten. Fast 81 % hatten spezifische IgG-Antikörper gegen BKV mit einem Durchschnittstitern von 1:115 (Tab. 5).

Bei den in Kapitel C 7 beschriebenen Tests mit Tumormaterial von 8 Tumorpatienten, 3 Patienten mit angeborenen Immundefekten, sowie einem Patient mit progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie (PML) konnte BKV, bzw. BKV-DNS nicht nachgewiesen werden. Weder die elektronenmikroskopische Untersuchung von Ultradünnschnitten, noch die nicht näher beschriebenen Kokultivierungsversuche von Tumorzellen des WAS-Patienten NA und des PML-Patienten mit permissiven Kulturzellen (HEL, HEB, Vero) zeigten die Anwesenheit von Viruspartikeln. Reassoziationskinetikstudien zum Nachweis viraler DNS in der DNS der Tumorzellen blieben ebenfalls negativ. Keine der untersuchten Tumor-DNS-Proben bewirkten eine Beschleunigung der Reassoziation der markierten viralen DNS. Somit war aus diesen Versuchen kein Hinweis auf die Anwesenheit viraler DNS in diesen Tumoren gegeben. Außer nicht bestätigten Ergebnissen (FIORI und DIMAYORCA, 1976) wurden bislang in einer Vielzahl verschiedener menschlicher Tumoren keine BKV-DNS-Sequenzen nachgewiesen (WOLD et al., 1978). Es erscheint daher fraglich, ob eine BKV-Infektion bei immunsupprimierten Patienten, die zwar ein erhöhtes Krebsrisiko besitzen (LEIBOWITZ und SCHWARTZ, 1971; WALDMAN und STROBER, 1972; HOOVER und FRAUMENI, 1973; KERSEY et al., 1973), notwendigerweise mit einer Tumorinduktion einhergeht. Obwohl sich offensichtlich BKV in solchen Patienten leicht vermehrt, scheint eine virale Ätiologie bestimmter Tumoren unwahrscheinlich. Nicht auszuschließen ist natürlich eine gelegentliche Tumorinduktion durch BKV, oder ein eventueller Zusammenhang zu bestimmten, seltenen Tumorarten. Weitere umfassende Untersuchungen bestimmter histologischer Tumorarten müßten hierzu weitere Aufklärung geben können.

Bei der regelmäßigen Titerkontrolle der Seren von 76 Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen im Alter zwischen 4 und 17 Jahren konnten lediglich in 3 Fällen eine Primärinfektion mit BKV gezeigt werden. Zum Zeitpunkt des Auftretens BKV-spezifischer Antikörper, der Serokonversion also, litten diese Patienten zusätzlich an Nierenstörungen, Harnwegsinfekt und

Leber-Milzvergrößerung (RZIHA et al., 1978b). Ähnliche Schädigungen wurden auch von anderen Autoren beobachtet, und daher eine Virusvermehrung in den Epithelzellen des Nierentrakts vermutet (GARDNER et al., 1971; COLEMAN et al., 1973). Im Verlauf der Serumpaارuntersuchungen wurde außerdem eine Persistenz der IgM-Antikörper gegen BKV bei je 2 Patienten während 2 Monaten und 3 Monaten, bei je einem Patient während 3 und sogar 11 Monaten beobachtet. Gleichzeitig ergab der HHT dieser Seren erhöhte Titer zwischen 1:160 und 1:1280. In drei weiteren Fällen wurden intermittierend auftretende IgM-Antikörper festgestellt, wie in Abbildung 28 dargestellt. Die, abweichend vom normalen Verlauf einer Antikörperantwort, über einen langen Zeitraum andauernde IgM-Produktion, die von JUNG et al. (1975) und von FLOWER et al. (1977) sogar während 3 Jahre beobachtet wurde, könnte durch eine permanente antigene Stimulierung erklärt werden. Eine ähnliche Situation wurde auch nach Rötelnvirusinfektion gefunden (AL NAKIB et al., 1975), wo noch nach einer länger zurückliegenden Infektion virusspezifische IgM-Antikörper nachweisbar blieben (PATTISON et al., 1975). Außerdem könnte das zwischenzeitliche Ansteigen der IgG-Antikörper und erneut nachweisbare IgM-Antikörper (Abb. 28) eine Virusreaktivierung, als Folge der immunsuppressiven Behandlung, bedeuten.

Von insgesamt 10 Patienten, die wegen maligner Erkrankungen immunsuppressiv behandelt worden waren (6 Patienten) oder angeborene Immundefekte hatten (4 Patienten), und von zwei Kleinkindern mit Mißbildungen ohne jegliche Störungen des Immunsystems, konnten Papovaviren aus deren Urin isoliert werden (Tab. 6). Zum Teil war die Viruskonzentration so hoch, daß eine Virusreinigung direkt aus den Urinproben möglich war. Alle Virusisolate konnten in menschlichen embryonalen Zellkulturen (HEL, HSF, HEK, HEB) angezüchtet werden. Eine Vermehrung in Verozellen gelang, im Gegensatz zum BKV-Prototyp nicht. Letzterer mag durch die fortlaufende Passagierung in diesen Affennierenzellen (GARDNER et al., 1971) eine gewisse Adaption

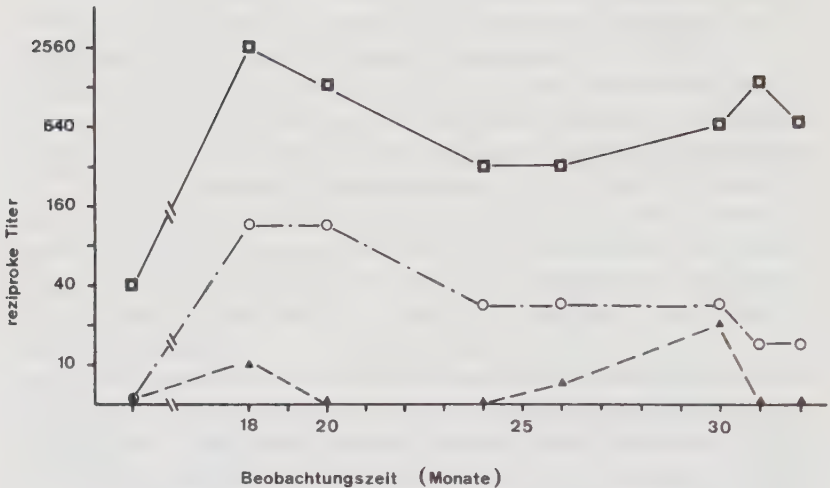


Abb. 28: Regelmäßige Titerkontrolle der Antikörper gegen BKV in Seren eines 11-jährigen Tumorpatienten. Zwischen der 1. und 2. Serumabnahme nach 18 Monaten standen keine Serumproben zur Verfügung. HHT (■—■), KBR (●---●), IgM-IF (▲---▲).

erreicht haben. Die schon beschriebenen, für Papovaviren typischen zytopathogenen Veränderungen zeigten sich 3 bis 10 Wochen nach der Inokulation. Die gleichzeitig nachweisbare Aktivität im Hämagglutinationstest wies darauf hin, daß diese Isolate keine SV 40-Varianten darstellten (PADGETT und WALKER, 1976). Die ikosaedrisch aufgebauten Virionen hatten durchschnittlich einen größeren Partikeldurchmesser (41 - 44 nm), als er für JC Virusisolate (38 - 43 nm) gefunden wurde (PADGETT

et al., 1971; PADGETT und WALKER, 1976). Durch Subkultivierung konnten alle Virusisolate weiter angezüchtet werden, ohne allerdings dem BKV entsprechende Virusaussbeuten zu erhalten. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der sedimentierten Urinproben fanden sich meist vereinzelt Viruspartikel, die oft leer, also ohne DNS waren. Selten konnten solche Anhäufungen von mehreren Virionen beobachtet werden, wie dies in Abbildung 16d dargestellt ist. Morphologische Varianten, wie filamentöse Formen (LECATSAS und PROZESKY, 1975) wurden nie entdeckt. Dagegen schienen häufig Partikel vorhanden zu sein, deren Kapsidhülle desintegriert war. Solche defekten Partikel und das Auftreten leerer Virionen, was auch von anderen Autoren berichtet wurde (GARDNER et al., 1971; DOUGHERTY und DISTEFANO, 1974; SEEHAFER et al., 1975), mag eine Erklärung für die meist geringen Ausbeuten an vollen, infektiösen Viruspartikeln sein.

Die ausgeprägte Reaktion in der Immunelektronenmikroskopie konnte als Hinweis gewertet werden, daß es sich bei den Virusisolaten um BKV, oder zumindest um einen nahe verwandten Virusstamm handelte. Alle als Antigen eingesetzten Isolate wurden in gleichem Ausmaß, wie BKV durch das Antiserum agglutiniert. Von SV 40 und JC Virus ist bekannt, daß diese auf Grund ähnlicher V-Antigendeterminanten zwar in diesem Test kreuzreagieren, aber in wesentlich geringerem Ausmaß (GARDNER et al., 1971; PENNEY und NARAYAN, 1973). Entsprechende Ergebnisse ergab der HHT und die VCA-Immunfluoreszenz mit den verschiedenen Isolaten als Antigene. Es zeigten sich Titer-schwankungen um höchstens eine Verdünnungsstufe. Dies bedeutete, daß keine stark verschiedenen antigenen Virustypen vorlagen, was im HHT bei zwei anderen menschlichen Virusisolaten gefunden wurde (LECATSAS und PROZESKY, 1975; GARDNER, 1977). Eine Möglichkeit des Nachweises von BKV, JC Virus oder SV 40 stellte der Fluoreszenztest auf T-Antigen dar. Dieses frühe, virusspezifische, aber nicht mit der Virushülle assoziierte Antigen ist für die drei Virustypen sehr ähnlich (SHAH et al., 1973; TAKEMOTO und MULLARKEY, 1973; DOUGHERTY, 1976a). Mittels eines T-Antigen-spezifischen Antiserums war es

möglich, innerhalb einer Woche nach Inokulation der Urinproben in Kulturzellen die Anwesenheit von Papovaviren nachzuweisen, ohne jedoch zwischen den drei Typen unterscheiden zu können. Dafür war eine relativ schnelle Nachweismöglichkeit auf diese Viren gegeben. Untersuchungen der Urine im HA-Test und dem HHT als Schnellnachweis erwiesen sich als unbrauchbar. Zwar reagierten einige der Urinproben im HHT mit ähnlichen Titern, wie dies von REESE et al. (1975) berichtet worden war. Es erscheint aber die Spezifität schon auf Grund der niedrigen Titer sehr fraglich. Unspezifische Hemmer der Hämagglutination können hierbei nicht ausgeschlossen werden.

Nachdem die untersuchten physikalischen und biologischen Eigenschaften der verschiedenen Virusisolate sich von denen des BKV nicht unterschieden, sollten vergleichende Analysen der DNS Aufschluß über die nähere Verwandtschaft dieser Viren geben. Bei der Reinigung der DNS aus vollen Viruskapsiden im CsCl-Äthidumbromid-Gradienten konnten kovalent geschlossene, zirkuläre DNS-Formen (Ko I) von den offenen Zirkeln (Ko II) und den linearen Molekülen (Ko III) getrennt werden. Auf Grund der geringeren Äthidumbromidbindung an Ko I DNS gegenüber Ko II und III (BAUER und VINOGRAD, 1968) fanden sich zwei DNS-Banden unterschiedlicher Dichte. Die gefundenen Dichten der DNS der Isolate mit 1.59 g/ml (Ko I) und 1.55 g/ml (Ko II, III) entsprachen denen der BKV-DNS (HOWLEY et al., 1975). Nach Elektrophorese im Agarosegel zeigten sie außerdem das gleiche Wanderungsverhalten (Abb. 18). Verglichen zur SV 40-DNS betrug das Molekulargewicht dieser Genome um 3×10^6 d. Die vergleichenden DNS-Analysen mit den vier Restriktionsenzymen Eco RI, Hind II/III, Alu I und Hae III wurden mit 8 Virusisolaten durchgeführt, die nach höchstens zweimaliger Subkultivierung in HEL-Zellen ausreichende Virusmengen zur DNS-Reinigung ergaben. Hierbei handelte es sich um die Isolate von 3 WAS-Patienten (NA, BH, CA), von 2 ALL-Patienten (HA, SA), sowie von je einem Patienten mit Morbus Hodgkin (SJ), mit Neuroblastom (KS) und mit Mißbildungen (WA). Die Spaltmuster der DNS-Fragmente der

Isolate und des BKV nach Verdau mit den vier Restriktions-
enzymen zeigten große Ähnlichkeit, unterschieden sich jedoch
deutlich von denen der SV 40-DNS und der in der Literatur
beschriebenen Fragmentmuster von JC Virus-DNS (OSBORN et al.,
1974; 1976). Dies ließ den Schluß zu, daß es sich bei den aus
verschiedenen, menschlichen Urinen isolierten Viren um zum BKV
sehr nahe verwandte Typen handelte. So besaßen deren Genome
alle eine Spaltstelle für das Enzym Eco RI, wodurch KoI-DNS
vollständig in Ko III umgewandelt wurde (Abb. 20). Bis auf ein
vor kurzem beschriebenes, neues BKV-Isolat, das zwei Eco RI-
Spaltstellen besaß (PAUW et al., 1978), wurde das gleiche auch
für andere menschliche BKV-Isolate berichtet (HOWLEY et al.,
1975b; OSBORN et al., 1976). Die Spaltung mit dem Restriktions-
enzym Hae III resultierte in 14 DNS-Fragmenten, die im 4%-igen
Akrylamidgel auftrennbar waren, und Molekulargewichte zwischen
 0.86 und 8.6×10^5 d hatten (Tab. 10). Lediglich die DNS des
Isolats BH hatte offensichtlich eine Spaltstelle weniger für
Hae III als die Genome der übrigen Isolate und des BKV.
Anstelle der in allen Fällen gefundenen Doppelbande JK besaß
die BH-DNS nur das Fragment J, das um 0.05×10^5 d größer war
(Abb. 22). Ansonsten zeigten alle untersuchten Isolate und das
BKV identische Hae III-DNS-Spaltmuster.

Zur weiteren vergleichenden Charakterisierung wurde die
Restriktionsendonuklease Hind II/III benutzt, die als Er-
kennungssequenz ein Hexanukleotid besitzt, und daher weniger
DNS-Bruchstücke zu erwarten waren (DANNA et al., 1973). Die
Spaltmuster der einzelnen BKV-Isolate wiesen hier deutliche
Unterschiede bezüglich der Anzahl und der Größe der auftreten-
den Fragmente auf. Auffallend war, daß die BKV-DNS in 6
Fragmente gespalten wurde (Abb. 21a). Dies stand im Gegensatz
zu den Ergebnissen anderer Autoren, die nur 4 Hind II/III-
Fragmente fanden (HOWLEY et al., 1975a, b; OSBORN et al.,
1976). Die deutlich schwächere Fluoreszenz der Banden C und D
gegenüber den übrigen Banden zeigte, daß diese zwei DNS-
Fragmente in geringerer Molarität vorhanden waren. Da dies

nicht auf eine unvollständige Spaltung der DNS zurückzuführen war, lag eine heterogene DNS-Präparation vor. Diese Heterogenität konnte jedoch nach Elektrophorese der ungespaltenen DNS im Agarosegel nicht gezeigt werden (Abb. 18). Da die eingesetzte DNS aus Viruspräparationen stammte, die siebenmal in Verozellen subkultiviert worden war, lag die Vermutung einer Anhäufung defekter Viruspartikel während der Zellkulturpassagierung nahe. Vom SV 40 ist bekannt, daß die Infektion permissiver Zellen mit hoher Virusmultiplizität die Vermehrung defekter Virionen mit defekten Genomen fördert (YOSHIIKE, 1968). Dabei entstehen virale DNS-Moleküle mit Deletionen, Substitutionen und Additionen (TAI et al., 1972; YOSHIIKE et al., 1972; YOSHIIKE und DEFENDI, 1977). Daß bei der Anzüchtung des BKV eine ähnliche Situation vorliegt, zeigten PORTOLANI et al. (1975) und SEEHAFFER et al. (1975). Die Heterogenität der DNS nicht klonierter BKV-Präparationen wurde sowohl durch Sedimentationsanalysen (HOWLEY et al., 1975a), als auch dem Auftreten submolarer DNS-Fragmente nach Restriktionsenzymverdau gezeigt (OSBORN et al., 1974; HOWLEY et al., 1975b). Da eine Plaquereinigung des BKV nicht gelang, wurde virale DNS aus Partikeln nach der ersten Passage in Verozellen gereinigt. Diese DNS wurde dann von Hind II/III nur noch in vier Fragmente A, B, C und F gespalten (Tab. 9). Dies entsprach den Ergebnissen, die mit DNS aus kloniertem BKV gefunden wurden (HOWLEY et al., 1975b). Das bedeutet, daß tatsächlich nach längerer Kultivierung in permissiven Zellen heterogene Viruspopulationen entstanden waren. Nicht geklärt wurde die Frage, ob hierbei DNS-Moleküle mit verschiedenen Deletionen oder Additionen in Form zusätzlicher viraler oder zellulärer Sequenzen gebildet wurden.

Die DNS-Spaltung der 8 Virusisolate mit Hind II/III zeigte fünf Spaltmuster, die sich in den kleineren Fragmenten unterschieden, während die Fragmente A, B und F immer identisch waren (Abb. 21, Tab. 9). Nur mit der DNS des Isolats SA trat ein submolar vorliegendes Bruchstück auf (Abb. 21b, C'); was auf

eine Heterogenität dieses Genoms hinweisen könnte. Die DNS der übrigen 7 Isolate war offensichtlich noch nach zweimaliger Subkultivierung homogen, was auch von HOWLEY et al. (1975b) beschrieben wurde. Dafür sprach auch die Tatsache, daß keine Unterschiede im Spaltmuster zwischen der DNS des Isolats NA gefunden wurden, das entweder direkt aus dem Urin isoliert werden konnte oder auf Kulturzellen angezüchtet worden war. Außer der SA-DNS mit dem submolaren Fragment, besaß die DNS des Isolats BH fünf Hind II/III-Fragmente. Alle übrigen Isolate wiesen vier Fragmente auf, wobei nur die SJ- und KS-DNS ein zum BKV identisches Spaltmuster hatte.

Ebenfalls fünf sich nur geringfügig voneinander unterscheidende Spaltmuster ergab die Spaltung mit der Endonuklease Alu I. Identisch zu BKV unter diesen Bedingungen waren die Genome der Isolate SJ, CA, HA und WA, wobei hier wiederum das Auftreten submolarer Fragmente auffiel (Abb. 23a). Diese fehlten alle der DNS des direkt aus dem Urin isolierten NA-Virus, das außerdem statt des Fragments E die Fragmente E₁ und E₂ besaß (Abb. 23b). Die vier weiteren Spaltmuster waren durch das unterschiedliche Vorkommen dieser submolaren Fragmente gekennzeichnet. Im Falle der KS-DNS führte eine zusätzliche Alu I-Spaltstelle zur Bildung des DNS-Bruchstücks S'.

Insgesamt gesehen handelte es sich bei diesen 8 aus verschiedenen menschlichen Urinen isolierten Viren um BKV, oder dem BKV sehr nahe verwandten Typen. Vor allem die Ergebnisse der Hind II/III-Spaltung wiesen darauf hin, daß stammspezifische Unterschiede bei BK Viren unterschiedlicher Herkunft bestehen. Ähnliches wurde vor kurzem bei zwei anderen BKV-Isolaten beschrieben (HOWLEY et al., 1975b; PAUW et al., 1978). Inwieweit das Fehlen der DNS-Fragmente nach Alu I-Verdau als stammspezifisch angesehen werden kann, muß offen bleiben. BK Viren können offensichtlich während ihrer Vermehrung in Kulturzellen, vielleicht aber auch bei der Aktivierung oder Reaktivierung im natürlichen Wirt, wirtsspezifische DNS-

Sequenzen aufnehmen, was eine Änderung des Restriktionsenzym-musters hervorrufen würde. Zur Beantwortung dieser Fragen müßten weitere Untersuchungen mit DNS klonierter Virusstämme durchgeführt werden.

Abschließend wurden die Proteinmuster des BKV und der verschiedenen Virusisolate in der SDS-Gelelektrophorese verglichen. Die Ergebnisse bestätigten die enge Verwandtschaft der einzelnen Virusstämme, da sich bei den durchgeführten Experimenten keine Unterschiede fanden. Drei niedermolekulare Polypeptide (VP 6-8), die wohl, wie bei anderen Papovaviren auch (ESTES et al., 1971; FREARSON und CRAWFORD, 1972; HUANG et al., 1972), zellulären Ursprungs waren, waren in Proteinpräparationen leerer Kapside nicht vorhanden, und werden als Histone angesehen (BARBANTI-BRODANO et al., 1975; SEEHAFFER et al., 1975; WRIGHT und DIMAYORCA, 1975). Über die Anzahl und Molekulargewichte der BKV-Proteine gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben (MULLARKEY et al., 1974; BARBANTI-BRODANO et al., 1975; SEEHAFFER et al., 1975). Bei den hier beschriebenen Versuchen fanden sich 5 Proteine in den gereinigten Viruspräparationen mit Molekulargewichten zwischen 41000 und 26500 d. Außerdem traten weitere Polypeptide höheren Molekulargewichts auf. Hierbei könnte es sich um Aggregate und/oder Vorläufer der eigentlichen Virusproteine handeln (SEEHAFFER et al., 1975; WRIGHT und DIMAYORCA, 1975). Eine Verunreinigung mit Fremdproteinen und, im Falle des Proteins mit 68000 d, eine Affinität des im Kulturmedium enthaltenen Serumzusatzes zur Virushülle konnte nicht ausgeschlossen werden. Nähere Untersuchungen hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Zusammenfassend rundeten diese Proteindarstellungen den Vergleich der isolierten Virusstämme mit dem BKV ab. Auf Grund nicht zuletzt der biologischen Parameter handelte es sich um BK Viren mit gleichem antigenem Verhalten, die aber in einigen Fällen stammspezifische Unterschiede ihres Genoms aufwiesen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verbreitung von Infektionen mit BK Virus (BKV), einem neuen menschlichen Papovavirus, untersucht. Die biologische Charakterisierung dieses Virus umfaßte neben der Bestimmung optimaler Vermehrungsbedingungen den Aufbau von Nachweisverfahren virusspezifischer Antigene. Mittels des Fluoreszenztests war es möglich BKV T-Antigene in infizierten Zellen nachzuweisen, und dadurch eine Virusinfektion relativ schnell zu erfassen. Weiterhin konnte mit einem ähnlichen Test der Zeitpunkt des Auftretens virusspezifischer Capsidantigene bestimmt werden. Zum serologischen Nachweis viraler Antikörper wurde der Hämagglutinationshemmtest (HHT) und die Komplementbindungsreaktion (KBR) standardisiert. Der Vergleich der Ergebnisse beider Tests ergab eine gute Übereinstimmung, so daß zur Untersuchung der Seroreaktivität verschiedener Patientengruppen nur der empfindlichere und zuverlässigere HHT angewendet wurde. Schließlich gelang es, mit der Methode der Immunfluoreszenz ein Verfahren zum Nachweis BKV-spezifischer IgM-Antikörper aufzubauen, und somit eine Erstinfektion festzustellen. Seroepidemiologische Untersuchungen verschiedener Altersgruppen zeigten eine hohe Durchseuchungsrate (70 %). Offensichtlich findet die Erstinfektion überwiegend im Vorschulalter statt. Die Persistenz der Antikörper bis ins hohe Lebensalter wies auf die fortgesetzte Anwesenheit des Virus im Organismus hin. Bei der Untersuchung von über 800 Nabelschnurblutseren fanden sich in 9.1 % der Fälle spezifische IgM-Antikörper gegen BKV. Dies machte die Möglichkeit einer nicht selten stattfindenden diaplazentaren Virusübertragung wahrscheinlich. Mit Seren von Neugeborenen und Kleinkindern ließen sich eine statistisch hoch signifikante Häufung positiver Seren im HHT und eine beträchtliche Anzahl prä- oder perinatal infizierter Kinder mit anormaler Leber- und Milzvergrößerung zeigen. Dieser Befund könnte möglicherweise darauf hinweisen, welche Krankheitserscheinungen das Virus bei

der Erstinfektion bedingt. Außerdem erhob sich die Frage eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der Virusinfektion und der Induktion von Embryo- oder Fetopathien.

Seren von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen, die immunsuppressiv behandelt worden waren, sowie von Patienten mit angeborenen Immundefekten hatten statistisch signifikant höhere Durchschnittstitern im HHT, verglichen mit entsprechenden Kontrollpopulationen. Offensichtlich führten diese Erkrankungen auf Grund der Immunsuppression zu einer Erhöhung des humoralen Antikörperspiegels. Obwohl bei solchen Patienten häufig BKV isoliert werden konnte, war es nicht möglich in entsprechenden Tumormaterialien BKV oder BKV-spezifische DNS-Sequenzen nachzuweisen. Im Verlauf der Untersuchungen ließ sich kein Zusammenhang zwischen BKV-Infektionen und bestimmten menschlichen Tumoren zeigen.

Aus den Urinproben von 6 Tumorpatienten, von 4 Patienten mit angeborenen Immundefekten und von 2 Kleinkindern mit angeborenen Mißbildungen konnten BK Viren isoliert werden. Besonderes Interesse kam hierbei letzteren beiden Virusisolaten zu, da es erstmals gelang, Virus von Patienten zu isolieren, die keinerlei Anzeichen einer Störung des Immunsystems hatten. Die biologische Charakterisierung dieser Virusstämme ergab im Vergleich zum BKV keinerlei Unterschiede. Der Vergleich der einzelnen Virusgenome mit der sehr empfindlichen Methode der Restriktionsenzymspaltung zeigte die nahe Verwandtschaft dieser Viren. Die Spaltung mit den Endonukleasen Hind II/III, Hae III und Alu I wies jedoch auf stammspezifische Unterschiede in einigen Fällen hin. Bei diesen Ergebnissen mußte allerdings berücksichtigt werden, daß keine klonierten Viruspräparationen vorlagen, da ein Plaquetest nicht gelang. Offensichtlich wurden zum Teil bei der Virusanzüchtung in Kulturzellen die Vermehrung defekter Partikel mit defekten Genomen gefördert, wodurch heterogene DNS-Populationen entstanden. Außerdem schien, zumindest das BKV, während der Vermehrung wirtsspezifische

Sequenzen aufzunehmen. Dennoch konnten die Unterschiede der Spaltnuster, vor allem nach Hind II/III-Verdau, auf Grund der homogen erscheinenden Isolate-DNS als stammspezifisch betrachtet werden. Die isolierten Papovaviren konnten somit wegen ihrer biologischen Eigenschaften, der - soweit untersucht - identischen Proteinmuster, und der sehr ähnlichen DNS-Spaltnuster als BKV-Typ identifiziert werden. Die Existenz verschiedener BKV-Stämme, die sich jedoch nur in einzelnen DNS-Fragmenten unterschieden, wurde gezeigt.

F. LITERATURANGABEN

Al-Nakib, W., J. M. Best, J. E. Banatvala (1975): Rubella-specific serum and nasopharyngeal immunoglobulin responses following naturally acquired and vaccine-induced infection. Prolonged persistence of virus-specific IgM. *Lancet* 1, 182-185.

Aloni, Y., E. Winocour, L. Sachs, J. Torten (1969): Hybridization between SV 40 DNA and cellular DNA's. *J. Mol. Biol.* 44, 333-345.

Ankerst, J., P. Christensen, L. Kjellen, G. Kronwall (1974): A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to Rubella virus: Absorption of IgG with *Staphylococcus aureus*. *J. Inf. Dis.* 130: 268-273.

Banatvala, J. E., J. M. Best, E. A. Kennedy, E. E. Smith, M. E. Spence (1967): A serological method for demonstrating recent infection by rubella virus. *Brit. Med. J.* 3: 285-286.

Banatvala, J. E., J. M. Best, J. Bertrand, N. A. Bown, S. M. Hudson (1970): Serological assessment of rubella during pregnancy. *Brit. Med. J.* 3, 247-259.

Barbanti-Brodano, G., G. P. Minelli, M. Portolani, L. Lambertini, M. Toppini (1975): Structural proteins of a human papova virus (BK virus): A comparison with the structural proteins of SV 40. *Virology* 64, 269-271.

Bauer, W. and J. Vinograd (1968): The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV 40 DNA in the presence and absence of dye. *J. Mol. Biol.* 33, 141-171.

Best, J. M., J. E. Banatvala, D. Watson (1969): Serum IgM and IgG responses in postnatally acquired rubella. *Lancet* 2, 65-67.

- Beth, E., M. Cikes, L. Schloen, G. DiMayorca, G. Giraldo (1977): Interspecies-, species- and type-specific T-antigenic determinants of human papovavirus (JC and BK) and of simian virus 40. *Int. J. Cancer* 20, 551-559.
- Black, P. H., W. P. Rowe, H. C. Turner, R. J. Huebner (1963): A specific complement-fixing antigen present in SV 40 tumor and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 50, 1148-1156.
- Blaese, R. M., W. Strober, R. S. Brown (1968): The Wiskott-Aldrich syndrome. A disorder with a possible defect in antigen processing or recognition. *Lancet* 1, 1056-1061.
- Bonin, O. (1973): *Quantitative-virologische Methodik*. Thieme Verlag - Stuttgart.
- Bornkamm, G. W., H. Delius, B. Fleckenstein, F.-J. Werner, C. Mulder (1976): Structure of herpesvirus saimiri genomes: Arrangement of heavy and light sequences in the M-genome. *J. Virol.* 19, 154-161.
- Brown, P., T. Tsai, D. C. Gajdusek (1975): Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am. J. Epidemiol.* 102, 331-340.
- Casals, J. (1967): Immunological techniques for animal viruses. in: *Methods in Virology* 3, K. Maramorosch, H. Koprowski eds., Acad. Press Inc., New York, 113-198.
- Coleman, D. V., S. D. Gardner, A. M. Field (1973): Human polyoma-virus infection in renal allograft recipients. *Brit. Med. J.* 3, 371-375.

Corallini, A., G. Barbanti-Brodano, M. Portolani, P. G. Balboni, M. P. Grossi, L. Possati, C. Honorati, M. La Placa, A. Mazzoni, A. Caputo, U. Veronesi, S. Orefice, G. Cardinali (1976): Antibodies to BK virus structural and tumor antigens in human sera from normal persons and from patients with various diseases, including neoplasia. *Infect. Immun.* 13, 1684-1691.

Corallini, A., G. Barbanti-Brodano, W. Bortoloni, I. Nenci, E. Cassai, M. Tampieri, M. Portolani, M. Borgatti (1977): High incidence of ependymomas induced by BK virus, a human papovavirus: *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 1561-1564.

Corallini, A., E. Cassai, M. P. Grossi (1978): Stable transformation of mouse, rabbit, and monkey cells and abortive transformation of human cells by BK virus, a human papovavirus. *J. gen. Virol.* 38, 369-374.

Costa, J., C. Yee, T. S. Tralka, A. S. Rabson (1976): Hamster ependymomas produced by intracerebral inoculation of a human papovavirus (MMV). *J. Natl. Cancer Inst.* 56, 863-864.

Costa, J., P. M. Howley, F. Legallais, C. Yee, N. Young, A. S. Rabson (1977): Oncogenicity of a nude mouse cell line transformed by a human papovavirus. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1147-1149.

Danna, K. J., D. Nathans (1971): Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenza*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68, 2913-2917.

Danna, K. J., G. H. Sack, D. Nathans (1973): Studies of simian virus 40 DNA. VII. A cleavage map of the SV 40 genome. *J. Mol. Biol.* 78, 363-376.

Davis, R. W., M. Simon, N. Davidson (1971): Electron microscopy heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. in: *Methods in Enzymology* 21, *Nucleic Acids*, Part D, L. Grossman, K. Moldave eds., Acad. Press, New York - London, 413-428.

Deutsch, H. F. and J. I. Morton (1957): Dissociation of human serum macroglobulins. *Science* 125, 600-601.

Dougherty, R. M., H. S. DiStefano (1974): Isolation and characterization of a papovavirus from human urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 481-487.

Dougherty, R. M. (1976a): A comparison of human papovavirus T antigens. *J. gen. Virol.* 33, 61-70.

Dougherty, R. M. (1976b): Induction of tumors in Syrian hamsters by a human renal papovavirus, RF strain. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 395-400.

Dulbecco, R. and M. Vogt (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exptl. Med.* 99, 167-182.

Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.

Estes, M. K., E.-S. Huang, J. S. Pagano (1971): Structural polypeptides of simian virus 40. *J. Virol.* 7, 635-641.

Feldmann, H. A. (1968): Removal by Heparin-MnCl₂ of nonspecific rubella hemagglutinin serum inhibitor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127, 570-573.

Felsenfeld, G. and S. Z. Hirschman (1965): A neighbour-interaction analysis of the hypochromism and spectra of DNA. *J. Mol. Biol.* 13, 407-427.

Fiers, W., K. Danna, R. Rogiers, A. van der Voorde, J. van Herreweghe, H. van Heuverswyn, G. Volckaert, R. Yang (1974): Approaches to the sequence determination of SV 40 DNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 179-186.

Fiori, M., G. Di Mayorca (1976): Occurrence of BK virus DNA in DNA obtained from certain human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 4662-4666.

Fleckenstein, B., G. W. Bornkamm, C. Mulder, F.-J. Werner, M. D. Daniel, L. A. Falk, H. Delius (1978): Herpesvirus ateles DNA and its homolgy with herpesvirus saimiri nucleic acid. J. Virol. 25, 361-373.

Flower, A. J. E., J. E. Banatvala, I. L. Chrystie (1977): BK antibody and virus - specific IgM responses in renal transplant recipients, patients with malignant disease, and healthy people. Brit. Med. J. 2, 220-223.

Fogh, J. and H. Fogh (1964): A method for direct demonstration of pleuropneumonia-like organisms in cultured cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 899-901.

Forghani, B., N. J. Schmidt, E. H. Lennette (1973): Demonstration of rubella IgM antibody by indirect fluorescent antibody staining, sucrose density gradient centrifugation and mercapto-ethanol reduction. Intervirology 1, 48-59.

Frearson, P. M. and L. V. Crawford (1972): Polyoma virus basic proteins. J. gen. Virol. 14, 141-155.

Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman, B. Hulme (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet 1, 1253-1257.

Gardner, S. D. (1973): Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.K.). Br. Med. J. 1, 77-78.

Gardner, S. D. (1977): The new human papovaviruses: their nature and significance. in: Recent Advances in Clin. Virol. No. I. A.P. Waterson ed., Churchill Livingstone.

Greene, P. J., M. C. Betlach, H. M. Goodman, H. W. Boyer (1974): The Eco RI restriction endonuclease. in: Methods in Molec. Biol. Series: DNA replication and biosynthesis, Vol. 7, Marcel Dekker Inc., New York, 87-111.

Greenlee, J. E., O. Narayan, R. T. Johnson, R. M. Herndon (1977): Induction of brain tumors in hamsters with BK virus, a human papovavirus. Lab. Invest. 36, 636-641.

Hanshaw, J. B. (1970): Developmental abnormalities associated with congenital cytomegalovirus infection. Advan. Teratol. 4, 64.

Hashida, Y., P. C. Gaffney, E. J. Yunis (1976): Acute hemorrhagic cystitis of childhood and papovavirus - like particles. J. Ped. 89, 85-87.

Henry, K., R. Bird, G. Watson, K. Hugh-Jones (1977): Aplastic anaemia, bone - marrow transplantation, and polyoma and other virus infections. Lancet 1, 695-696.

Hoover, R. and J. F. Fraumeni (1973): Risk of cancer in renal transplant recipient. Lancet 2, 55-57.

Howley, P. M., M. F. Mullarkey, K. K. Takemoto, M. A. Martin (1975a): Characterization of human papovavirus BK DNA. J. Virol. 15, 173-181.

Howley, P. M., G. Khoury, J. C. Byrne, K. K. Takemoto, M. A. Martin (1975b): Physical map of the BK virus genome. J. Virol. 16, 959-973.

Howley, P. M., G. Khoury, K. K. Takemoto, M. A. Martin (1976): Polynucleotide sequences common to the genomes of simian virus 40 and the human papovaviruses JC and BK. *Virology* 73, 303-307.

Huang, E.-S., M. K. Estes, J. S. Pagano (1972): Structure and function of the polypeptides in simian virus 40.

I. Existence of subviral deoxynucleoprotein complexes.

J. Virol. 9, 923-929.

Humphrey, J. H. and G. White (1971): *Immunology for students of medicine*. Oxford, Blackwell.

Jerkofsky, M. and F. Rapp (1973): Host cell DNA synthesis as a possible factor in the enhancement of replication of human adenoviruses in simian cells by SV 40. *Virology* 51, 466-473.

Jung, M., U. Krech, P. C. Price, M. N. Pyndiah (1975): Evidence of chronic persistent infections with polyomaviruses (BK type) in renal transplant recipients. *Arch. Virol.* 47, 39-46.

Kersey, J. H., B. D. Spector, R. A. Good (1973): Primary immunodeficiency diseases and cancer: the immunodeficiency cancer registry. *Int. J. Cancer* 12, 333-347.

Khoury, G., P. M. Howley, C. Garon, M. F. Mullarkey, K. K. Takemoto, M. A. Martin (1975): Homology and relationship between the genomes of papovaviruses, BK virus and SV 40.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 2563-2567.

Lang, D. and M. Mitani (1970): Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers. *Biopolymers* 9, 373-379.

Laufs, R. and B. Fleckenstein (1972): Zur serologischen Diagnostik der Rötelnkrankung während der Schwangerschaft und die Röteln-embryopathie. *221. Bakt. Hyg. I. A. Orig.* 220, 235-239.

Lecatsas, G., O. W. Prozesky, J. van Wyk, H. J. Els (1973): Papova virus in urine after renal transplantation. *Nature* 241, 343-344.

Lecatsas, G., O. W. Prozesky, F. Scheepers (1974): The cytopathology and development of a human polyoma virus (B. K.). *Arch. Ges. Virusforsch.* 44, 319-327.

Lecatsas, G. and O. W. Prozesky (1975): Excretion of morphological variants of human polyoma virus. *Arch. Virol.* 47, 393-397.

Lecatsas, G., B. D. Schoub, O. W. Prozesky, F. Pretorius, F. C. de Beer (1976a): Polyoma virus in urine in aplastic anaemia. *Lancet* 1, 259-260.

Lecatsas, G., B. D. Schoub, O. W. Prozesky (1976b): Development of a new human polyoma virus strain (MG). *Arch. Virol.* 51, 327-333.

Lecatsas, G., B. D. Schoub, A. R. Rabson, M. Joffe (1976c): Papovavirus in human lymphocyte cultures. *Lancet* 2, 907-908.

Lecatsas, G., F. Pretorius, H. Grewe-Brown, E. Requadt, J. Ackthun (1977a): Polyomavirus in urine in pernicious anaemia. *Lancet* 2, 147.

Lecatsas, G., E. Blignaut, B. D. Schoub (1977b): Lymphocyte stimulation by urine-derived human polyoma virus (BK). *Arch. Virol.* 55, 165-167.

Leibowitz, S., R. S. Schwartz (1971): Malignancy as a complication of immunosuppressive therapy. *Adv. Int. Med.* 17, 95-103.

Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mäntyjärvi, R. A., P. P. Arstilla, O. H. Meurman (1972): Hemagglutination by B. K. virus, a tentative new member of the papovavirus group. *Infect. Immun.* 6, 824-828.

Mäntyjärvi, R. A., O. H. Meurman, L. Vilma, B. Berglund (1973): A human papovavirus (B.K.), biological properties and sero-epidemiology. *Ann. Clin. Res.* 5, 283-287.

Major, E. O., G. DiMayorca (1973): Malignant transformation of BHK 21 clone B cells by BK virus - a human papovavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3210-3212.

Maraldi, N. M., G. Barbanti-Brodani, M. Portolani, M. La Placa (1975): Ultrastructural aspects of BK virus uptake and replication in human fibroblasts. *J. gen. Virol.* 27, 71-80.

Mason, D. H., K. K. Takemoto (1977): Transformation of rabbit kidney cells by BKV (MM) human papovavirus. *Int. J. Cancer* 19, 391-395.

Melnick, J. L. (1976): Taxonomy of viruses. *Progr. Med. Virol.* 22, 211-221.

Miao, R., R. M. Dougherty (1977a): Characterization of human papovavirus RFV: comparison with SV 40 and BKV. *J. gen. Virol.* 35, 67-75.

Miao, R., R. M. Dougherty (1977b): Characterization of human papovavirus RFV: use of iodinated viral DNA to detect viral DNA sequences in cellular DNA. *Virology* 77, 856-859.

Middleton, J. H., M. H. Edgell, C. A. Hutchinson (1972): Specific fragments of ϕ X 174 deoxyribonucleic acid produced by a restriction enzyme from *Hemophilus aegyptius*, endonuclease Z. *J. Virol.* 10, 42-50.

- Mulder, C. and H. Delius (1972): Specificity of the break produced by restricting endonuclease R_1 in simian virus 40 DNA, as revealed by partial denaturation mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 3215-3219.
- Mullarkey, M. F., J. F. Hrnska, K. T. Takemoto (1974): Comparison of two human papovaviruses with SV 40 by structural protein and antigenic analysis. *J. Virol.* 13, 1014-1019.
- Narayan, O., J. B. Penney, R. T. Johnson, R. M. Herndon, L. P. Weiner (1973): Etiology of progressive multifocal leukoencephalopathy. *New Engl. J. Med.* 289, 1278-1282.
- Nathans, D. and H. O. Smith (1975): Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 273-293.
- Nonoyama, M., J. S. Pagano (1973): Homology between EBV-DNA and viral DNA from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma determined by DNA-DNA reassociation kinetics. *Nature (London)* 242, 44-47.
- O'Connor, G. T., A. S. Rabson, R. A. Malmgren, I. K. Berezesky, F. J. Paul (1965): Morphologic observations of green monkey kidney cells after single and double infection with adenovirus 12 and simian virus 40. *J. Natl. Cancer Inst.* 34, 679-693.
- Osborn, J. E., S. M. Robertson, B. L. Padgett, G. M. Zur Rhein, D. L. Walker, B. Weisblum (1974): Comparison of JC and BK human papovavirus with SV 40: Restriction endonuclease digestion and gel electrophoresis of resultant fragments. *J. Virol.* 13, 614-622.
- Osborn, J. E., S. M. Robertson, B. L. Padgett, D. L. Walker, B. Weisblum (1976): Comparison of JC and BK human papovavirus with simian virus 40: DNA homology studies. *J. Virol.* 19, 675-684.

Ostle, B. (1963): Statistics in research, sec. ed., The Iowa State Univ. Press.

Padgett, B. L., G. M. ZuRhein, D. L. Walker, R. J. Eckroade (1971): Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257-1260.

Padgett, B. L. and D. L. Walker (1976): New human papovaviruses. *Progr. Med. Virol.* 22, 1-35, Karger, Basel.

Pages, J., S. Manteuil, D. Stephelin, M. Fiszman, M. Marx, M. Girard (1973): Relationship between replication of simian virus 40 DNA and specific events of the host cell cycle. *J. Virol.* 12, 99-107.

Pattison, J. R., D. S. Dane, J. E. Mace (1975): Persistence of specific IgM after natural infection with rubella virus. *Lancet* 1, 185-187.

Pauw, W. and J. Choufoer (1978): Isolation of a variant of BK virus with altered restriction endonuclease pattern. *Arch. Virol.* 57, 35-42.

Penney, J. B. and O. Narayan (1973): Studies of the antigenic relationships of the new human papovaviruses by electron microscopy agglutination. *Infect. Immun.* 8, 299-300.

Pope, J. H. and W. P. Rowe (1964): Detection of specific antigen in SV 40 transformed cells by immunofluorescence. *J. Exp. Med.* 120, 121-127.

Portolani, M., A. Marzocchi, G. Barbanti-Brodano, M. LaPlaca (1974): Prevalence in Italy of antibodies to a new human papovavirus (B.K.). *J. Med. Microbiol.* 7, 543-546.

Portolani, M., G. Barbanti-Brodano, M. LaPlaca (1975): Malignant transformation of hamster kidney cells by BK virus. J. Virol. 15, 420-422.

Portolani, M., M. Borgatti, A. Corallini, E. Cassai, M. P. Grossi, G. Barbanti-Brodano, L. Possati (1978): Stable transformation of mouse, rabbit and monkey cells and abortive transformation of human cells by BK virus, a human papovavirus. J. gen. Virol. 38, 369-374.

Rabson, R., G. T. O'Connor, I. K. Berezsky, F. J. Paul (1964): Enhancement of adenovirus growth in African green monkey kidney cell cultures by SV 40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 187-190.

Radloff, R. W., W. Bauer, J. Vinograd (1967): A dye-bouyand density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HELA cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 57, 1514-1521.

Rapp, F., T. Kitahara, J. S. Butel, J. L. Melnick (1964): Production of antibodies to papovavirus SV 40 tumor antigen in African green monkeys. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 194-198.

Rapp, F., J. S. Butel, L. A. Feldman, T. Kitahara, J. L. Melnick (1965): Differential effects of inhibitors on the steps leading to the formation of SV 40 tumor and virus antigen. J. Exp. Med. 121, 935-944.

Reese, J. M., M. Ressig, R. W. Daniel, K. U. Shah (1975): Occurrence of BK virus and BK virus-specific antibodies in the urine of patients receiving chemotherapy for malignancy. Infect. Immun. 11, 1375-1381.

Reimer, C. B., C. M. Black, D. J. Phillipps, L. C. Logan, E. F. Hunter, B. J. Pender, B. E. McGrew (1975): The specificity of fetal IgM: Antibody or anti-antibody? Ann. N.Y. Acad. Sci. 254, 77-93.

Roberts, R. J., P. A. Myers, A. Morrison, K. Murray (1976): A specific endonuclease from *Arthrobacter luteus*. *J. Mol. Biol.* 102, 157-165.

Robinson, R. A., R. H. Strokes (1955): Electrolyte solutions. Acad. Press, New York.

Roblin, R., E. Härtle, R. Dulbecco (1971): Polyoma virus proteins. I. Multiple virion components. *Virology* 45, 555-566.

Rodriguez, J. and F. Deinhardt (1960): Preparation of semi-permanent mounting medium for fluorescent antibody studies. *Virology* 12, 316-320.

Roggendorf, M., K. E. Schneeweis, M. H. Wolff (1976): Rubella virus hemagglutination inhibition IgM antibodies: The method of absorption of IgG by Staphylococcal protein A as compared with density gradient ultracentrifugation. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A* 235, 363-372.

Rundell, K., P. Tegtmayer, P. J. Wright, G. DiMayorca (1977): Identification of the human papovavirus T antigen and comparison with the simian virus 40 protein A. *Virology* 82, 206-213.

Rziha, H.-J., G. W. Bornkamm, H. zur Hausen (1978a): BK Virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 165, 73-81.

Rziha, H.-J., B. H. Belohradsky, U. Schneider, H. U. Schwenk, G. W. Bornkamm, H. zur Hausen (1978b): BK Virus: II. Serologic studies in children with congenital disease and patients with malignant tumors and immunodeficiencies. *Med. Microbiol. Immunol.* 165, 83-92.

Salzman, N. P. and G. Khoury (1974): Reproduction of papovaviruses. *Comprehensive Virol.* 3, H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner eds., Plenum Press, New York - London, 63-126.

Schmitz, H., D. Kampa, H. W. Doerr, T. Luthardt, H. G. Hillemanns, A. Würtele (1977): IgM antibodies to cytomegalovirus during pregnancy. Arch. Virol. 53, 177-184.

Schneider, U. and H. zur Hausen (1975): EBV-induced transformation of human leukocytes after cell fractionation. Int. J. Cancer 15, 59-66.

Seehafer, J., A. Salmi, D. G. Scraba, J. S. Colter (1975): A comparative study of BK and polyoma viruses. Virology 66, 192-205.

Seehafer, J., A. Salmi, J. S. Colter (1977): Isolation and Characterization of BK virus-transformed hamster cells. Virology 77, 356-366.

Seehafer, J., P. Carpenter, D. N. Dasner, J. S. Colter (1978): Observations on the growth and plaque assay of BK virus in cultured human and monkey cells. J. gen. Virol. 38, 383-387.

Sever, J. L. (1962): Applications of a microtechnique to viral serological investigations. J. Immunol. 88, 320-328.

Shah, K. V., R. W. Daniel, R. M. Warszawski (1973): High prevalence of antibodies to B.K. virus, a SV 40-related papovavirus, in residents of Maryland. J. Inf. Dis. 128, 784-787.

Shah, K. V., R. W. Daniel, J. D. Strandberg (1975): Sarcoma in a hamster inoculated with BK virus, a human papovavirus. J. Natl. Cancer Inst. 54, 945-949.

Shah, K. V., R. W. Daniel, K. R. Stone, A. Y. Elliott (1978): Investigation of human urogenital tract tumors for papovavirus etiology. J. Natl. Cancer Inst. 60, 579-582.

Siegel, M. and M. Greenberg (1960): Fetal death, malformation, and prematurity after maternal rubella - results of a prospective study 1949 - 1958. *New Engl. J. Med.* 262, 389.

Simmons, D. T., K. K. Takemoto, M. A. Martin (1977): Relationship between the methionine tryptic peptides of simian virus 40 and BK virus tumor antigens. *J. Virol.* 24, 319-325.

Simmons, D. T., K. K. Takemoto, M. A. Martin (1978): Properties of simian virus 40 and BK virus tumor antigens from productively infected and transformed cells. *Virology* 85, 137-145.

Stagno, S., D. W. Reynolds, A. Tsiantos, D. A. Fuccillo, W. Long, C. A. Alford (1975): Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natally acquired cytomegalovirus infections. *J. Inf. Dis.* 132, 568-577.

Sten, M., A. Tolonen, V. M. Pitko, T. Nevalainen, R. A. Mäntyjärvi (1976): Characterization of cell lines derived from hamster tumors induced with the BK virus. *Arch. Virol.* 50, 73-82.

Subramanian, K. N., J. Pan, S. Zain, S. M. Weissman (1974): *Nucleic Acids Res.* 1, 727-752.

Tabuchi, K., W. M. Kirsch, M. Low, D. Graskin, J. van Buskirk, S. Maa (1978): Screening of human brain tumors for SV 40 - related T antigen. *Int. J. Cancer* 21, 12-17.

Taguchi, F., D. Nagaki, M. Saito, C. Haruyama, K. Iwasaki, T. Suzuki (1975): Transplacental transmission of BK virus in human. *Japan. J. Microbiol.* 19, 395-398.

Tai, H. T., C. A. Smith, P. A. Sharp (1972): Sequence heterogeneity in closed SV 40 DNA. *J. Virol.* 9, 317-325.

Takemoto, K. K. and M. F. Mullarkey (1973): Human papovavirus, BK strain: biological studies including antigenic relationship to SV 40. J. Virol. 12, 625-631.

Takemoto, K. K., A. S. Rabson, M. F. Mullarkey, C. F. Garon, D. Nelson (1974): Isolation of papovavirus from brain tumor and urine of a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. J. Natl. Cancer Inst. 53, 1205-1207.

Takemoto, K. K. and M. A. Martin (1976): Transformation of hamster kidney cells by BK papovavirus DNA. J. Virol. 17, 247-253.

Thorne, H. V. (1973): Cyclic variation in susceptibility of Balb-C 3T3 cells to polyoma virus. J. gen. Virol. 18, 163-169.

Uchida, S., S. Watanabe, T. Aizawa, K. Kato, A. Furuno, T. Muto (1976): Induction of papillary ependymomas and insulinomas in the Syrian golden hamster by BK virus, a human papovavirus. Gann 67, 857-865.

Valentine, C., B. M. Shapiro, R. E. Stadtman (1968): Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from Escherichia coli. Biochemistry 7, 2143-2152.

van der Noorda, J. (1976): Infectivity, oncogenicity, and transforming ability of BK virus and BK virus DNA. J. gen. Virol. 30, 371-373.

Vogt, P. K. (1969): Immunofluorescent detection of viral antigens. in: Fundamental Techniques in Virology, K. Hebel and N.P. Salzman eds., Acad. Press Inc., New York - London, 316-326.

Waldmann, T. A. and W. Strober (1972): Immunodeficiency disease and malignancy. Ann. Int. Med. 77, 605-628.

Walker, D. L., B. L. Padgett, G. M. ZuRhein, A. E. Albert, R. F. Marsh (1974): Current study of an opportunistic papova-virus. in: Slow Virus Diseases, W. Zeman and E. H. Lennette, Williams and Wilkins, Baltimore, 49-58.

Walter, E. (1975): Biomathematik für Mediziner, Teubner Studienbücher.

Weber, K. and M. Osborn (1969): The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

Wetmur, J. G. and N. Davidson (1968): Kinetics of renaturation of DNA. J. Mol. Biol. 31, 349-370.

Wold, W. S. M., J. K. MacKey, K. H. Brackmann, N. Takemori, P. Rigden, M. Green (1978): Analysis of human tumors and human malignant cell lines for BK virus-specific DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 454-458.

Wright, P. J. and G. di Mayorca (1975): Virion polypeptide composition of the human papovavirus BK: comparison with SV 40 and polyoma virus. J. Virol. 15, 828-835.

Wright, P. J., G. Bernhardt, E. V. Major, G. DiMayorca (1976): Comparison of the serology, transforming ability, and polypeptide composition of human papovaviruses isolated from urine. J. Virol. 17, 762-775.

Yang, R., A. Vandevoorde, W. Fiers (1976): Specific cleavage and physical mapping of simian virus 40 DNA by the restriction endonuclease of *Arthrobacter luteus*. Europ. J. Biochem. 61, 119-138.

Yoshiike, K. (1968): Studies on DNA from low-density particles of SV 40. I. Heterogeneous defective virions produced by successive undiluted passages. Virology 34, 391-401.

Yoshiike, K. and A. Furuno (1972): Denaturation maps of complete and defective simian virus 40 DNA molecules. J. Mol. Biol. 70, 415-423.

Yoshiike, K. and V. Defendi (1977): Addition of extra DNA sequences to simian virus 40 DNA in vivo. J. Virol. 23, 323-337.

ZuRhein, G. M. and J. Varakis (1974): Papovavirions in urethelium of treated lymphoma patient. Lancet 2, 783-784.

zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford, L. Santesson (1970): EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinoms of the nasopharynx. Nature (London) 228, 1056-1058.

Lebenslauf

5. April 1949 Als Sohn des Dipl.Ing. Herbert Rziha und seiner Ehefrau Hanne, geb. Treubel in Bad Tölz geboren.
- Sept.55 - Juli 59 Besuch der Volksschule Nürnberg
- Sept.59 - Juli 61 Besuch des Städt. Realgymnasiums Nürnberg
- Sept.61 - Juli 68 Besuch des Städt. Marie-Therese-Gymnasiums Erlangen
23. Juli 1968 Reifeprüfung
- 1968 - 1974 Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
31. Oktober 1972 Vordiplomprüfung
21. Mai 1975 Diplomprüfung
Diplomarbeit: Untersuchungen zum Nachweis spezifischer Antigenkomponenten in Gewebekulturzellen von menschlichen Melanomen.
- 1975 - 1977 Wiss. Ang. am Institut für Klinische Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg
- seit Jan. 1978 Wiss. Ang. an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen.

Hanns - Joachim Rziha

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990